

X KONGRES MIKROBIOLOGA SRBIJE
„MIKROMED 2015”

Beograd, 16-18. april 2015.

**X KONGRES
MIKROBIOLOGA
SRBIJE
„MIKROMED 2015”
Zbornik radova**

MIKROMED 2015

ORGANIZATORI

UDRUŽENJE MIKROBIOLOGA SRBIJE, Beograd

UDRUŽENJE MEDICINSKIH MIKROBIOLOGA SRBIJE, Beograd

Izdavač: UDRUŽENJE MIKROBIOLOGA SRBIJE, Nemanjina 6, Beograd

Za izdavača: Dragojlo Obradović, predsednik Udruženja

Urednici:

Dragojlo Obradović

Lazar Ranin

Štampa:

Megaphone d.o.o., Beograd

Tiraž:

250 primeraka

ISBN 978-86-914897-2-4

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

579.61(082)(0.034.2)

КОНГРЕС микробиолога Србије Микромед (10 ; 2015 ;
Београд)
Mikromed 2015 [Elektronski izvor] : zbornik radova
/ X Kongres
mikrobiologa Srbije, Beograd, 16-18. april 2015. ;
[urednici Dragojlo
Obradović, Lazar Ranin]. - Beograd : Udruženje
mikrobiologa Srbije, 2013
(Beograd : Megaphone). - 1 elektronski optički disk
(CD-ROM) ; 12 cm

Sistemski zahtevi: Nisu navedeni. - Nasl. sa naslovne
strane dokumenta. -
Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 250.

ISBN 978-86-914897-2-4

1. Удружење микробиолога Србије (Београд)
а) Медицинска микробиологија - Зборници
COBISS.SR-ID 214452492

SADRŽAJ

PREDAVANJA PO POZIVU

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ODABRANIH SREBRNIH PREMAZA NANOČESTICA – NAŠE INICIJALNO ISKUSTVO

Vaso Taleski, Darko Bošnjakovski, Milka Zdravkovska, Zdenka Stojanovska,
Marija Dimitrova, Nevenka Jordanova 1

MOLEKULARNO ISPITIVANJE RNK VIRUSA KOD SLEPIH MIŠEVA

Valentina Nikolić, Gorana Stamenković, Jelena Jovanović, Milan Paunović,
Maja Stanojević 5

USUTU VIRUS – NOVI VIRUS U EVROPI

Vesna Milošević, Ivana Hrnjaković Cvjetković 8

ISPITIVANJE NEKIH BIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA GLIKOPROTEINSKIH SUBJEDINICA SOJA PHY - LMV. 42 VIRUSA NEWCASTLE BOLESTI ŽIVINE

Nenad Milić, Jakov Nišavić, Sunčica Borožan, Andrea Zorić 9

SKRINING, DIJAGNOSTIKA I MONITORING VIRUSNIH INFEKCIJA U TRUDNOĆI

Maja Čupić 21

ULOGA GENETIČKE VARIJABILNOSTI HBV U PATOGENEZI FULMINANTNOG HEPATITISA

Ivana Lazarević 28

IMUNOPATOGENEZA WEST NILE VIRUSNE INFEKCIJE I RAZVOJ VAKCINE

Vesna Kovačević-Jovanović 35

REZULTATI PRAĆENJA REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE U SRBIJI – LOKALNA AKCIJA I UČEŠĆE U GLOBALNIM AKTIVNOSTIMA

Zora Jelesić, Mira Mihajlović-Ukropina 41

PREVALENCIJA ANTIMIKROBNE REZISTENCIJE KOD HUMANIH NETIFOIDNIH IZOLATA SALMONELLA ENTERICA U SRBIJI

Nataša Galić-Živanić, Ljiljana Pavlović, Edita Grego 43

TRENDOVI REZISTENCIJE STREPTOCOCCUS PYOGENES I STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE NA ANTIBIOTIKE U SRBIJI

Nataša Opavski, Vera Mijač, Ina Gajić, Edita Grego, Dušan Kekić, Boris
Jegorović, Lazar Ranin 47

ANAEROBNE BAKTERIJE U ETIOLOGIJI HUMANIH INFEKCIJA

Marina Dinić, Branislava Kocić..... 49

IMUNOPATOGENEZA INFEKCIJE H. PYLORI

Biljana Miljković Selimović, Tatjana Babić, Branislava Kocić..... 55

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA NEPETA NUDA

Dragoljub L. Miladinović, Budimir S. Ilić, Branislava D. Kocić..... 75

STRONGILOIDOZA KOD IMUNOKOMPROMITOVANIH BOLESNIKA

Aleksandar Džamić, Sanja Mitrović, Ivana Čolović Čalovski 83

PNEUMOCYSTIS JIROVECI – NOVA SAZNANJA O BIOLOGIJI, PATOGENZI I DIJAGNOZI

Sanja Mitrović, Ivana Čolović Čalovski, Aleksandar Džamić 91

IMUNODIJAGNOSTIKA HUMANE HIDATIDOZE

Nataša Miladinović Tasić..... 99

VEKTORSKE ZARAZNE BOLESTI U SRBIJI

Ivana Čolović Čalovski, Sanja Mitrović, Aleksandar Džamić 101

GENETIČKI DIVERZITET TUMOROGENIH BAKTERIJA IZOLOVANIH IZ MALINE SA SIMPTOMIMA BAKTERIOZNOG RAKA U SRBIJI

Nemanja Kuzmanović, Anđelka Prokić, Milan Ivanović, Nevena Zlatković,
Katarina Gašić, Aleksa Obradović 106

BIOLOŠKI POTENCIJAL EKSTRAKATA MAKROMICETA IZ PRIRODNIH STANIŠTA

Anita Klaus, Maja Kozarski, Jovana Vunduk,
Željko Žižak, Miomir Nikšić..... 108

TRICHODERMA IZOLOVANA IZ AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA KAO ANTAGONISTA BOTRYTIS CINEREA

Jelena Jovičić Petrović, Vera Raičević 116

PROPOLIS I SMOLA OD DRVENASTIH BILJAKA IZ SRBIJE KAO IZVORI ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI

Slaviša Stanković, Ivica Dimkić, Tanja Berić..... 126

PREŽIVLJAVANJE FEKALNIH INDIKATORA I PSEUDOMONAS AERUGINOSA U PRIRODNOJ MINERALNOJ VODI

Dragoljub Cvetković, Aleksandra Veličanski, Aleksandra Zurovac 128

ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA SOJEVA RODA SALMONELLA IZOLOVANIH IZ ZEMLJIŠTA I SEDIMENTA U SRBIJI

Dragan Radnović, Dragana Čučak, Olivera Babić, Ivica Tamaš..... 129

EVOLUCIJA METANOTROFIJE KOD BEIJERINCKIACEAE BAZIRANA NA
KOMPARATIVNOJ GENOMICI

Ivica Tamaš 131

BIOKATALITIČKA PRIMENA BAKTERIJSKE 4 –OKSALOKROTONAT
TAUTOMERAZE

Lidija Đokić 132

EFEKTIVNOST FOTOKATALITIČKIH PREMAZA PREMA
MIKROORGANIZMIMA

Ana Vidaković, Siniša Markov, Aleksandra Velićanski 137

OD AKCIDENTA DO KORIŠĆENJA POTENCIJALA BIOGEOCENOZA ZA
REMEDIJACIJU

Jelena Milić, Mila Ilić 139

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPA BOBIČASTOG VOĆA

Aleksandra Velićanski, Dragoljub Cvetković, Siniša Markov 150

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA ACHROMOBACTER VRSTA
IZOLOVANIH KOD PEDIJATRIJSKIH PACIJENATABrankica Filipić, Milka Malešević, Zorica Vasiljević, Katarina Novović,
Milan Kojić, Branko Jovčić 152SAZNANJA IZ DETALJNE ANALIZE LIPIDOMA ODABRANIH SOJEVA RODA
STREPTOMYCES

Tatjana Ilić-Tomić 158

KARAKTERIZACIJA CRONOBACTER SPP. IZOLOVANOG IZ BILJNIH ČAJEVA

Vera Katić, Marija Stojanović 161

TRANSMISIJA NOROVIRUSA I HEPATITIS A VIRUSA U TOKU RUKOVANJA
SA HRANOM

Dragoslava Radin, Branko Velebit 163

PRIMENA DOBRE HIGIJENSKE PRAKSE KOD MALOG OBIMA PROIZVODNJE I
TRADICIONALNIH PROIZVOĐAČA HRANE ŽIVOTINJSKOG POREKLA

Neđeljko Karabasil, Tamara Bošković, Mirjana Dimitrijević 165

UČESTALOST AFLATOKSINA U HRANI U SRBIJI

Sunčica Kocić-Tanackov, Gordana Dimić, Marija Škrinjar 167

MIKROBIOLOŠKI KRITERIJUMI I BEZBEDNOST HRANE U REPUBLICI SRBIJI
– AKTUELNA SITUACIJA

Svetlana Raketić, Vesna Šumanov 168

USMENE PREZENTACIJE**NOVI BIOMARKERI U DIJAGNOSTICI HPV INFEKCIJE**

Vesna Milošević, Gordana Kovačević 171

KREDIBILITET LABORATORIJSKIH REZULTATA KAO PROIZVOD STANDARDIZACIJE LABORATORIJSKOG RADA, REDOVNOG UČEŠĆA U TESTIRANJU OSPOSOBLJENOSTI I MEĐULABORATORIJSKOG POREĐENJA REZULTATA: PRIMER TESTIRANJA POTENCIJE HUMANOG ANTIRABIJSKOG IMUNOGLOBULINA BRZIM TESTOM INHIBICIJE FLUORESCENTNIH FOKUSA

Srđan Stankov, Nenad Vranješ, Verica Simin,
Dragana Vujin, Dušan Lalošević..... 172

VARIJABILNOST EBNA-1 GENA U IZOLATIMA EPSTEIN BARR VIRUSA KOD PACIJENATA U SRBIJI

Ana Banko, Ivana Lazarević, Goran Stevanović, Miljan Folić,
Maja Čupić, Tanja Jovanović..... 173

REKONSTRUKCIJA EVOLUCIONOG POREKLA I FILOGEOGRAFSKA ANALIZA VIRUSA KRIMSKE-KONGO HEMORAGIJSKE GROZNICE NA OSNOVU S GENSKOG SEGMENTA

Valentina Nikolić, Gorana Stamenković, Marina Šiljić,
Ana Gligić, Maja Stanojević 175

VARIJABILNOST INFLUENZA A VIRUSA - UZROCI I POSLEDICE

Vesna Milošević, Jelena Radovanov 177

FORENZIČKO ISTRAŽIVANJE SLUČAJA TRANSMISIJE VIRUSA HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE FILOGENETSKIM PRISTUPOM

Marina Šiljić, Dubravka Salemović, Valentina Nikolić, Đorđe Jevtović,
Ivana Pešić-Pavlović, Jovan Ranin, Marija Todorović, Maja Stanojević 179

VIRUSI U VODI - METODOLOGIJA, IZAZOVI I ZNAČAJ

Vesna Milošević, Aleksandra Jovanović Galović 181

INVAZIVNA LISTERIOZA – PRIKAZ SLUČAJA

Milena Branković, Dubravka Papić Damjanović, Jelena Lekić 182

CLOSTRIDIUM DIFFICILE U DVE ZDRAVSTVENE USTANOVE U BEOGRADU: REZULATI PCR RIBOTIPIZACIJE

M. Jovanović, M. Rupnik, T. Tošić, S. Jovanović, B. Stošović,
Z. Stojanović Varagić, M. Drakulović, S. Janežić 183

ZASTUPLJENOST MULTIREZISTENTNOG PSEUDOMONAS AERUGINOSA I FENOTIPSKA DETEKCIJA METALOBETALAKTAMAZA KOD BOLNIČKIH IZOLATA U KLINIČKOM CENTRU NIŠ U PERIODU 2011-2014. GODINE

Snežana Mladenović-Antić, B.Kocić, M.Dinić, G.Randjelović, P.Stojanović... 184

UTICAJ ANTIBIOTIKA NA ADHERENCIJU, HIDROFOBNOŠĆ I PRODUKCIJU BIOFILMA INVAZIVNIH I NEINVAZIVNIH IZOLATA STREPTOCOCCUS PYOGENES

Aleksandra Šmitran, Ljiljana Božić, Nataša Vučković Opavski,
Ina Gajić, Lazar Ranin 186

ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI BAKTERIOCINA LICHENIOCIN 50.2 I BAKTERIOCINA SOJA LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS BIOVAR. DIACETYLLACTIS BGBU1-4 NA KLINIČKE IZOLATE LISTERIA MONOCYTOGENES

Veselin Draganić, Ivana Ćirković, Dragana Božić, Jelena Lozo, Tanja Berić,
Biljana Arsić, Eliana Garalejić, Slobodanka Đukić, Slaviša Stanković 188

PRIMENA STANDARDA ZA KONTROLU PODLOGA EN ISO 11133:2014 U AKREDITOVANIM LABORATORIJAMA ZA ISPITIVANJE HRANE I VODE

Svetlana Rakezić, Danka Jovanović 190

KOMPARATIVNA ANALIZA DISK DIFUZIONOG METODA I E-TESTA U ISPITIVANJU OSETLJIVOSTI MULTIREZISTENTNIH SOJEVA BAKTERIJA RODA ACINETOBACTER NA TIGECIKLIN

Boris Jegorović, Dušan Kekić, Maja Travar,
Snežana Jovanović, Lazar Ranin 192

OSETLJIVOST GRUPE B STREPTOKOKA NA ANTIBIOTIKE U TROGODIŠNJEM PERIODU (2010-2014.) U BEOGRADU

Dušan Kekić, Boris Jegorović, Ina Gajić, Nataša Opavski, Marina Stojković,
Snežana Tomanović, Slobodanka Stefanović, Lazar Ranin 194

PROTOKOL UZIMANJA I OBRADJE UZORAKA DERMATOLOŠKIH PACIJENATA U MIKROBIOLOŠKOJ LABORATORIJI JZU „SVETI VRAČEVI“ BIJE LJINA

Jelena Nastasić-Femić 196

BILJNI EKSTRAKTI: POTENCIJALNI PRIRODNI ANTIBAKTERIJSKI AGENSI

Olgica Stefanović, Katarina Mladenović, Mirjana Grujović, Braho Ličina,
Ivana Radojević, Ljiljana Čomić 198

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST METANOLNOG EKSTRAKTA GLJIVE CORIOLUS VERSICOLOR OBOGAĆENE ORGANSKIM I NEORGANSKIM IZVOROM SELENA

Dunja Duvnjak, Milena Pantić, Danka Matijašević, Ljubinko Jovanović,
Ivana Vasiljević, Milana Lazović, Miomir Niksić 200

GENETIČKI DIVERZITET SOJEVA XANTHOMONAS ARBORICOLA PV. CORYLINA I RAZVOJ MOLEKULARNIH MARKERA ZA BRZU IDENTIFIKACIJU PATOGENA

Anđelka Prokić, Nemanja Kuzmanović, Milan Ivanović, Katarina Gašić, Nevena Zlatković, Maja Tolinački, Nataša Golić, Milan Kojić, Aleksa Obradović	202
IZOLOVANJE I KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKIH SOJEVA KONZORCIJUMA MIKROORGANIZAMA KOJI RAZGRAĐUJU P-NITROFENOL	
Marija Lješević, B. Kekez, Gordana Gojgić-Cvijović, Vladimir Beškoski, Miroslav M. Vrvic	204
IZOLOVANJE I BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA MIKROORGANIZAMA IZOLEOVANIH IZ AKTIVNOG MULJA POSTROJENJA ZA PRERADU OTPADNIH VODA "HIP PETROHEMIJA" PANČEVO	
Marija Radoja, Slađana Popović, Mila V. Ilić, Gordana Gojgić-Cvijović, Vladimir P. Beškoski, Miroslav M. Vrvic	205
UTICAJ STARTER KULTURE NA PROMENU MIKROBIOTE TOKOM PROIZVODNJE PETROVAČKE KOBASICE	
Bojana Milićević, Bojana Danilović, Natalija Džinić, Dragiša Savić	206

POSTERI

ZASTUPLJENOST HEPATITIS C VIRUSNE INFEKCIJE U POPULACIJI JUŽNOBAČKOG OKRUGA	
Nataša Nikolić, Hrnjaković Cvjetković I, Patić A, Radovanov J, Kovačević G, Galović Jovanović A, Milošević V	208
RESPIRATORNE VIRUSNE INFEKCIJE KOD DECE JUŽNOBAČKOG OKRUGA	
Aleksandra Patić, Hrnjaković Cvjetković I, Nikolić N, Radovanov J, Kovačević G, Galović Jovanović A, Milošević V	209
INNOVIROLOGY: MREŽA EVROPSKIH NASTAVNIKA/TRENERA ZA VIRUSOLOGIJU	
E. Gómez-Lucía, A. Dolei, R. Lavigne, S. LePoder, C. Logue, D. Radin, M. Szyndel, B. Wölk	210
UČESTALOST IZOLACIJE I ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST ESBL PRODUKUJUĆIH ENTEROBAKTERIJA UZROČNIKA URINARNIH INFEKCIJA	
Jasminka Bokan-Hajnal, Gordana Kovrlja	212
MOLEKULARNA DETEKCIJA H.PYLORI METODOM RT-PCR U KLINIČKOM MATERIJALU	
Vesna Protić-Đokić, Dragutin Jovanović, Sonja Atanasievska, Elizabeta Ristanović	214

PRIKAZ SLUČAJA SALMONELOZNOG PERITONITISA
IMUNOKOMPROMITOVANOG DETETA

Gordana Jovanović, S. Matić, R. Popović, T. Tojčić, A. Kitić 216

MIKROBIOLOŠKA KONTROLA TALOGA ALBUMINA U PROCESU
PROIZVODNJE HUMANOG ALBUMINA

Slavica Milosavljević, Laura Balint 217

IMPORTOVANA DIFILOBOTRIJAZA U CRNOJ GORI – PRIKAZ SLUČAJA

Rajna Dapčević, Žarko Nikčević, Dunja Nikčević 219

OSETLJIVOST *PROTEUS MIRABILIS* BIOFILMA NA PRISUSTVO
EKSTRAKATA BILJAKA I LIŠAJEVA

Sava M. Vasić, Ivana D. Radojević, Olgica D. Stefanović, Ljiljana R. Čomić... 220

ANTIBAKTERIJSKI I CITOTOKSIČNI EFEKAT ETARSKOG ULJA THYMUS
CAPITATUS HOFFMS. ET LINK.

Bojana Jovanović, Marina Jovanović, Biljana Nikolić, Dragana Mitić-Ćulafić, Ana
Džamić, Petar Marin, Jelena Knežević-Vukčević 221

KARAKTERIZACIJA PROBIOTSKIH SVOJSTAVA HUMANIH IZOLATA
LACTOBACILLUS PLANTARUM

Marina Jovanović, Jelena Novaković Jovanović, Biljana Nikolić,
Svetlana Šeatović, Gordana Zavišić, Dragana Mitić-Ćulafić,
Branka Vuković-Gačić, Jelena Knežević-Vukčević 223

ANTIVRUSNO DEJSTVO KOMPLEKSA PALADIJUMA(II) I PLATINE(II) SA 2-
(DIFENILFOSFINO) BENZALDEHID 1-ADAMANTOIL HIDRAZONOM

Vera Simić, Stoimir Kolarević, Ilija Brčeski, Dejan Jeremić,
Branka Vuković-Gačić 224

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST KOMPLEKSA PALADIJUMA(II) I PLATINE(II)
SA 2-(DIFENILFOSFINO) BENZALDEHID 1-ADAMANTOIL HIDRAZONOM

Vera Simić, Stoimir Kolarević, Ilija Brčeski, Dejan Jeremić,
Rajko Čebedžić, Branka Vuković-Gačić 226

PRIMENA IBR METODE (INTEGRATED BIOMARKER RESPONSE) U
MIKROBIOLOŠKOJ ANALIZI VODENIH EKOSISTEMA

Jovana Kostić, Karolina Sunjog, Stoimir Kolarević, Margareta Kračun-Kolarević,
Mustafa Aborgiba, Jelena Knežević-Vukčević, Branka Vuković-Gačić 228

PRIMENA BAGREMOVOG MEDA U PROIZVODNJI FERMENTISANIH
NAPITAKA NA BAZI SURUTKE

Maja Vukašinović-Sekulić, Marica Rakin, Maja Bulatović, Tanja Krunić 230

**UTICAJ HIGIJENE PROCESA PROIZVODNJE NA MIKROBIOLOŠKU
BEZBEDNOST SLADOLEDA**

Ivana Filipović, Katica Mihajlović..... 232

**ZASTUPLJENOST IZOLATA STAPHYLOCOCCUS AUREUS REZISTENTNIH
NA PENICILIN I MRSA IZ UZORAKA NAMIRNICA I BRISEVA**

Suzana Živadinović Tasić, Svetlana Čolović, Vera Katić..... 234

NALAZ ENTEROTOKSOGENIH STAFILOKOKA U MEKIM SIREVIMA

Radoslava Savić Radovanović, Vera Katić, Svetlana Čolović..... 235

**ACINETOBACTER SPP BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
SOJA IZOLOVANOG IZ IZVORSKE VODE NA VLASINI**

Srđan Tasić, Dragojlo Obradović, Irena Tasić..... 237

**CITROBACTER FREUNDII BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
SOJA IZOLOVANOG IZ OLIGOMINERALNE VODE ZA PIĆE**

Srđan Tasić, Dragojlo Obradović, Irena Tasić..... 238

PREDAVANJA PO POZIVU**CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY
OF ESSENTIAL OILS FROM PLANT SPECIES OF GENUS SATUREJA L.**

Tatjana Mihajilov-Krstev, Dragan Radnović, D. Kitić 240

INDEKS AUTORA..... 242

PREDAVANJA PO POZIVU

MIKROMED 2015

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SELECTED SILVER NANOPARTICLES COATINGS - OUR INITIAL EXPERIENCE

Vaso Taleski¹, Darko Bosnjakovski¹, Milka Zdravkovska¹, Zdenka Stojanovska¹,
Marija Dimitrova², Nevenka Jordanova²

¹University „Goce Delchev”, Faculty of medical sciences, Shtip, Macedonia

²Public health laboratory, Department of microbiology, Shtip, Macedonia

Nanoparticles exhibit chemical and physical properties significantly different to their macro-scale counterparts composed of the same substance (due to higher surface/volume ratio, colour, solubility, diffusivity, material strength, toxicity, thermodynamic, magnetic, optical and other properties) and may have unique impacts on health and environment. Extremely small size (1-100 nm) enables them to enter the human body through usual or unusual routes, pass through cell membranes, or cross the blood-brain barrier. Gravity loses impact and importance, surface tension and Van der Waals constants have more importance in the system of nanoparticles.

Nanotechnology is already used in various applications, with potential to be applied at any stage in food industry: production, preservation, processing, packaging, transport, nanobarcodes for food authenticity and tracing, labelling, keeping the quality of food products, extending the products shelf-life, removal of undesirable tastes, flavours or allergens from food products, nano (bio)sensors for food safety, water filtration.

Risks of nanotechnology are still unknown and unpredictable. Initial scientific studies showed negative effects on living organisms and a potential for serious threat to human health.

Authorities of the most developed countries, have set up, guidance documents and procedures for nano-enabled products based on existing regulations, appropriate *in vitro* and *in vivo* ADME studies (absorption, distribution, metabolism and excretion) and requirements for standardised and harmonised analytical test methods for proper risk assessments, clear identification and characterization of nano-hazards.

Nanotechnology in medicine (Nanomedicine) applies for rapid and sensitive detection of pathogenic bacteria and low levels of viruses, in

small sample_volumes, at lower costs than current in-use technologies. This advance in early detection enables accurate and prompt treatment. Nano-robots to make repairs at the cellular level are under development.

Rapid and sensitive detection methods, based on nano (bio) sensors, are developed for food-borne pathogens *E. coli*, especially *E. coli O157:H7*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *C. jejuni*, *E. cloacae*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Detection sensor to detect bacterial biofilm formation on surfaces are under development.

Antibiotics have been one of the greatest successes in medicine. But there is growing concern that „Golden age of antibiotics“ is coming to an end. Director General of the World Health Organization, recently declared that the world is heading towards a post-antibiotic era and resistance to antibiotics possess a „Major global threat“ to public health. Some scientists are talking about antibiotic apocalypse and a terrible future succeeded antibiotic resistance. New strategies to combat multy drug resistant microorganisms (MDR) are urgently needed and nanomaterials are very promising approach. Small size provides large surface of nanoparticles and at least 50% of molecules will react to the microorganisms.

Metal nanomaterials (silver, gold, copper, titanium, zinc, magnesium, cadmium, and alumina) possess advantage of unique antimicrobial activities. Scientists offers also new complex antibacterial and antiviral nano systems on the basis of metal oxides or intermetallic oxide compounds (such as TiO₂, ZrO₂, SnO and SiO₂).

Nanoparticles can be synthesized by reactions in solid state (breaking the larger materials) and chemical methods (wet chemical synthesis). Ionic silver is not the same as metallic silver nanoparticles, metallic silver is not water soluble but ionic silver is water soluble. Inside the human body ionic silver quickly combines with chloride to form an insoluble compound called silver chloride which is far less reactive than metallic silver nanoparticles. Ionic silver cannot survive inside the human body because blood serum is rich in sodium and potassium chloride that quickly forming silver chloride. Only metallic silver nanoparticles can survive inside the body because they are unaffected by chloride ions.

Some studies established that silver ions has strongest bactericidal effect, cooper and gold weaker one. Silver ions have 61 neutrons, 46 electrons, 47 protons (one proton more than electrons) that gives positive charge. The size of a silver atom is 0.288 nm in diameter.

Different theories and hypothesis explaining the mechanism of action of silver ions on microorganisms includes:

- Interaction of electrostatic forces between bacterial cells carrying negative charge
- and silver ions positively charged,
- Oxidation and destruction of bacterial cytoplasm by oxygen dissolved in water,
- where silver ions play catalyst role,
- Direct influence on DNA, increasing quantity of intracellular free radicals,
- Inhibition of the transmembrane transport of Na^+ and Ca^{++}
- Silver ions absorbed on the surface of microbial cells, penetrates the cells and
- inhibits enzymes of the respiratory chain,
- Silver ions reacts with Peptidoglycans blocking their ability to transfer oxygen into bacterial cells (mammalian cells contain no Peptidoglycans therefor silver ions do not affect mammalian cells).

As a result of successful association between bacterial cells-cells and cells-surfaces, single or multiple bacterial species make biofilms which present very favorable environment. In biofilms, mechanically protected, bacteria freely grow and develop resistance to chemicals and antibiotics. Bacteria can adhere and produce biofilms on dental implants, catheters, artificial hips, prosthesis, contact lens, wounds and lungs.

Silver ions are known non-toxic to human cells in low concentrations.

Antimicrobial activity for silver ions is most studied on a model on *E. coli* for Gram-negative and *Staphylococcus aureus* for Gram positive bacteria.

In our preliminary study on antibacterial activity of several different compositions of nanoparticle coatings (titanium, inox and silver), we

found antimicrobial activity of silver, double composition of titanium and silver against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, but not for *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. More extensive studies will follow.

Key words:

Nanoscience, nanoparticles, silver, ions, biofilm, antimicrobial, antibiotic, resistance.

References:

1. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan SM, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study, *International Journal of Nanomedicine*, 2012;7 6003–6009.
2. Bata-Vidács I, Adányi, Beczner NJ, Farkas J, SzékácsA. Nanotechnology and Microbial Food Safety. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.) © FORMATEX 2013.
3. Belkemyshv VI, Makhonin II. Nanomaterials and Coatings with Antimicrobial Properties. Nanoscience and nanotechnologies. Nanoscience and Nanotechnologies. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).
4. Duncan V. T. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011 Nov 1; 363(1):1-24.
5. Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial affect. *International Journal of Nanomedicine*, 2010;5, 261-267.
6. Santos CL, Albuquerque AJR, Sampaio FC, Keyson D. Nanomaterials with Antimicrobial Properties: Applications in Health Sciences. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.) © FORMATEX 2013.
7. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275 (2004) 177–182.
8. Troitzch D, Borutzky U, Junghannz U. Detection of antimicrobial efficacy in silver-coated medical devices. *Hyg Med*, 2009, 34 (3).

MOLEKULARNO ISPITIVANJE RNK VIRUSA KOD SLEPIH MIŠEVA

Valentina Nikolić¹, Gorana Stamenković², Jelena Jovanović³, Milan Paunović³, Maja Stanojević¹

¹ Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

² Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

³ Prirodnjački muzej Beograd

Uvod: Slepí miševi predstavljaju veoma broján red u klasi sisara – poznato je preko 1000 vrsta slepih miševa, koji čine oko petine ukupnog broja klasifikovanih vrsta sisara. Evropski kontinent naseljavaju 52 vrste slepih miševa, dok je u Srbiji opisano prisustvo 29 vrsta iz tri porodice (Rhinolophidae, Vespertilionidae i Miniopteridae). Sve vrste slepih miševa u Srbiji spadaju u strogo zaštićene (1). Mnogi virusi uzročnici zoonoza mogu da inficiraju slepe miševe, iz kojih je do sada izolovano ili genetički dokazano preko 200 virusa, iz različitih virusnih familija, uključujući paramiksovirus, koronavirus, filovirus, kao i hantavirus (2). Srbija spada u endemsko područje za hantavirus, sa uobičajenom pojavom sporadičnih slučajeva hemoragijske groznice sa bubrežnim sindromom i periodičnom pojavom epidemija (3). Prisustvo hantavirusa je na našem području dokazano u različitim životinjskim rezervoarima, pre svega u različitim vrstama glodara (4). S druge strane, paramiksovirusi su ubikvitarno rasprostranjeni i povezani sa širokim rasponom kliničkih ispoljavanja kod čoveka, a za pojedine – Hendravirus, Nipah virus, je dokazano da slepi miševi mogu da budu neposredan ili posredan izvor infekcije za čoveka. Do sada nisu rađena molekularna istraživanja prisustva humanih ili zoonotskih virusa kod slepih miševa u Srbiji. Cilj naše studije je istraživanje prisustva genetičkog materijala paramiksovirusa i hantavirusa u uzorcima slepih miševa u Srbiji.

Metode: U studji su analizirani uzorci 95 jedinki uginulih slepih miševa, pronađenih i sakupljenih na različitim lokacijama u Srbiji, u periodu od 2002. do 2009. godine. Jedinke su morfološki identifikovane do nivoa vrste i čuvane na temperaturi od –20°C do daljeg ispitivanja. Totalna prisutna RNK ekstrahovana je iz uzoraka unutrašnjih organa/pluća, postupkom trizolne ekstrakcije (GibcoBRL, Invitrogen, Karlsruhe, Nemačka), prema uputstvu proizvođača dok je ukupna DNK ekstrahovana primenom komercijalnog kita (Purelink Genomic extraction kit,

Invitrogen, San Diego, Kalifornija, SAD), prema uputstvu proizvođača. Kvalitet ekstrakcije nukleinskih kiselina testiran je primenom samostalno dizajniranih prajmera za citohrom B slepih miševa, kao i univerzalnih prajmera za beta-aktinsku iRNK, kao pozitivnu kontrolu za RT-PCR. Virusna RNK je detektovana RT-PCR metodom u dva kruga umnožavanja. Za dokazivanje hantavirusne RNK korišćeni su degenerativni prajmeri za konzervirani deo L segmenta, koji umnožavaju sve poznate hantaviruse (5). Za dokazivanje paramiksovirusne RNK korišćeni su prajmeri koji umnožavaju obe paramyxoviridae potfamilije (6). Dobijeni PCR produkti analizirani su elektroforezom u 1% agaroznom gelu.

Rezultati: Sakupljene životinje su identifikovane kao sledeće vrste: *Rhinolophus ferrumequinum*, *Hypsugo savii*, *Myotis alcaethoe*, *Myotis brandtii*, *Myotis myotis*, *Myotis mystacinus*, *Myotis oxygnathus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Pipistrellus pygmaeus*, *Pipistrellus nathusii*, *Plecotus auritus*, *Plecotus austriacus*. U svim testiranim uzorcima dobijen je pozitivan nalaz kontrolne DNK i/ili RNK, kao potvrda očuvanosti tkiva i uspešne ekstrakcije. Ipak, ispitivana virusna RNK nije dokazana ni u jednom testiranom uzorku.

Zaključak: U našoj stidji, koja predstavlja prvo molekularno istraživanje virusne infekcije slepih miševa kod nas, u testiranim uzorcima nismo našli prisustvo hanta i paramiksovirusne RNK. Premda smo kontrolnim analizama potvrdili očuvanost uzoraka tkiva, ne može da se isključi mogućnost da je uzrok negativnog nalaza propadanje ciljne nukleinske kiseline, s obzirom da uzorci potiču od uginulih životinja. Većina pozitivnih nalaza u sličnim studijama u svetu urađena je na svežim uzorcima kao što su uzorci stolice, urina ili usni brisevi živih životinja (7-10). Broj istraživanja koja ukazuju na ulogu slepih miševa kao potencijalnih izvora zoonotskih virusa je sve veći. U dizajniranju i izvođenju sličnih studija koje se bave ugroženim i zaštićenim vrstama, poseban značaj ima izbor načina uzorkovanja. Dalja istraživanja slepih miševa kao potencijalnih rezervoara virusnih infekcija u Srbiji su u toku.

Literatura:

1. Paunović, M., Karapandža, B., Ivanović, S. (2011). Bats and Environmental Impact Assessment – Methodological guidelines for environmental impact assessment and strategic environmental impact

- assessment. Wildlife Conservation Society "MUSTELA", 1-142, Belgrade.
2. Kohl C, Kurth A. European bats as carriers of viruses with zoonotic potential. *Viruses*. 2014 Aug;6(8):3110-28.
 3. Gligic A, Dimkovic N, Xiao SY, Buckle GJ, Jovanovic D, Velimirovic D, Stojanovic R, Obradovic M, Diglisic G, Micic J, et al. Belgrade virus: a new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J Infect Dis*. 1992, 166(1):113-20.
 4. Stanojevic M, Nikolic V, Stajkovic N, Stamenkovic G, Bozovic B, Cekanac R, Marusic P, Gligic A. Genetic detection of Dobrava-Belgrade hantavirus in the edible dormouse (*Glis glis*) in central Serbia. *Epidemiol Infect*. 2015, 143(2):400-4.
 5. Klempa, B., E. Fichet-Calvet, E. Lecompte, B. Auste, V. Aniskin, H. Meisel, C. Denys, L. Koivogui, J. terMeulen, and D. H. Kruger, 2006: Hantavirus in African wood mouse. *Guinea. Emerg. Infect. Dis.* 12, 838–840.
 6. Tong S, Chern SW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ, Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses *J Clin Microbiol*. 2008 Aug;46(8):2652-8
 7. Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO,: A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:4269–4274.
 8. Hayman DT, Bowen RA, Cryan PM, McCracken GF, O'Shea TJ, Peel AJ, Gilbert A, Webb CT, Wood JL. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health*. 2013, 60(1):2-21.
 9. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, Gloza-Rausch F, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Oppong SK, Kalko EK, Osterman A, Rasche A, Adam A, Müller MA, Ulrich RG, Leroy EM, Lukashev AN, Drosten C. (2012) Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol* 86(17):9134–9147
 10. Drexler, J.F.; Geipel, A.; König, A.; Corman, V.M.; van Riel, D.; Leijten, L.M.; Bremer, C.M.; Rasche, A.; Cottontail, V.M.; Maganga, G.D.; *et al.* Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 16151–16156.

USUTU VIRUS - NOVI VIRUS U EVROPI

Vesna Milošević, Ivana Hrnjaković Cvjetković

Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, Srbija

Medicinski fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

Usutu virus je flavivirus iz serokompleksa Japanskog encefalitisa poreklom iz Afrike. Životni ciklus virusa se odvija između ornitofilnih komaraca, kao vektora i divljih ptica, kao rezervoara. Slučajni domaćini, nepodesni za inficiranje komaraca, su ljudi, konji i glodari. U Evropi virus je prvi put dokazan 2001. godine u Beču u ptice *Turdus merula* uginule od encefalitisa. U narednim godinama virus je dokazan u ptica u Italiji, Mađarskoj, Nemačkoj, Španiji, Švajcarskoj, Engleskoj, Grčkoj i Belgiji. Prvi slučaj infekcije čoveka registrovan je u Centralno Afričkoj Republici 1981. i manifestovao se groznicom i osipom. Prva dva humana slučaja u Evropi registrovana su 2009. god u Italiji, gde je virus izolovan iz likvora i gde je genom virusa sekvencioniran. U Italiji infekcija je dokazana u dva imunokompromitovana bolesnika u kojih su se javili groznica, neurološki simptomi i fulminantni hepatitis.

Pojava humanih slučajeva u kojima je ispoljen neurotropizam virusa podstakla je razvoj real-time PCR testova za dokazivanje virusa u krvi i likvoru ljudi. Takođe su razvijeni komercijalni serološki testovi za dokazivanje IgG antitela na Usutu virus koji su koristi u fazi posle viremije. Problem ukrštenih reakcija u okviru porodice *Flaviviridae* je prisutan, posebno za IgG klasu. Prevazilazi se testiranjem seruma neutralizacionim testom redukcije plakova koji izvide referentne laboratorije, budući da se radi sa živim virusima i pri nivou zaštite III (BSL III). Serološke studije koje su sprovedene u Italiji, Nemačkoj, Hrvatskoj i preliminarno ispitivanje sprovedeno na malom uzorku u Institutu za javno zdravlje Vojvodine ukazuju na aktivnost virusa u humanoj populaciji. Značaj ovoga virusa za humanu medicinu tek treba da bude sagledan daljim ispitivanjima koja treba da budu multidisciplinarna i da uključe entomologe, ornitologe, veterinare i lekare - mikrobiologe, epidemiologe i infektologe.

Ključne reči: usutu virus, real time PCR, serološki testovi

**ISPITIVANJE NEKIH BIOLOSKIH KARAKTERISTIKA
GLIKOPROTEINSKIH SUBJEDINICA SOJA PHY-LMV.42
VIRUSA NEWCASTLE BOLESTI ŽIVINE**

Nenad Milić, Jakov Nišavić, Sunčica Borožan, Andrea Zorić
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

UVOD

Ispitivanje bioloških karakteristika i imunogenih svojstava glikoproteinskih antigena lentogenih sojeva virusa Newcastle bolesti u cilju njihove primene za pripremanje vakcina bilo je predmet istraživanja mnogih autora (Milić i sar., 1996., Tanabayashi i Compans, 1996., Alexander, 2000., Panshin i sar., 2001.). Virus Newcastle bolesti je jedan od najznačajnijih patogena u populaciji ptica i domaće živine koji izaziva atipičnu kugu živine, kontagiozno oboljenje koje prati visoka stopa morbiditeta i mortaliteta što ima za posledicu i velike ekonomske gubitke u živinarstvu. S' obzirom da je za pripremanje efikasnih vakcina za sprovođenje imunoprofilakse atipične kuge živine od posebnog značaja izbor imunogenih vakcinalnih antigena, vršena su mnoga ispitivanja strukture, genetičkih i antigenskih karakteristika velikog broja lentogenih i mezogenih sojeva virusa Newcastle bolesti sa posebnim osvrtom na hemaglutinaciona i imunogena svojstva njihovih glikoproteinskih komponenti (Maas i sar., 2003., Arora i sar., 2010., Chatuverdi i sar., 2011., Ganar i sar., 2014.). Najznačajnije strukturne komponente prečišćenih viriona virusa Newcastle bolesti predstavljaju najmanje 6 virusnih proteina koji obuhvataju: hemaglutininsko-neuraminidazni protein (HN), fuzioni protein (F), matriksni protein (M), nukleokapsidni protein (NP), fosfoprotein (P) i veliki protein (L) među kojima su imunološki najznačajniji HN i F glikoproteini spoljašnjeg virusnog omotača koji imaju značajnu ulogu i u procesu ostvarivanja infekcije jer omogućavaju adsorpciju virusa na površinu membrane ćelije domaćina (Alexander, 2000., Römer-Oberdorfer i sar., 2003.). Dosadašnja iskustva u primeni inaktivisanih i živih vakcina u imunoprofilaksi Newcastle bolesti živine su ukazala da iste, pored toga što vakcinisanim životinjama omogućavaju postizanje zadovoljavajućeg imuniteta, imaju i izvesne nedostatke. Tako, na primer, žive vakcine protiv virusa Newcastle bolesti kod vakcinisanih životinja stimulišu stvaranje imuniteta zaštitnog

karaktera, ali često dovode i do pojave nepoželjnih postvakcinalnih efekata koji se manifestuju pojavom respiratornih poremećaja, dok u nekim slučajevima postoji mogućnost da vakcinalni sojevi virusa povrate svoju virulenciju posle višekratnih retrogradnih pasaža kroz prijemčive organizme u terenskim uslovima (Roth, 1999., Alexander, 2000.). Za razliku od živih vakcina, imunogeni pripremljeni od inaktivisanih sojeva virusa Newcastle bolesti su mnogo bezbedniji za vakcinisane životinje, ali su često slabije imunogeni tako da se najčešće konjuguju sa različitim adjuvansima od kojih se najčešće koriste uljane emulzije, što često dovodi do zapaljenskih procesa na mestu aplikacije vakcine (Homhuan i sar., 2004.). U cilju prevazilaženja nedostataka klasičnih vakcina protiv atipične kuge živine u novije vreme se sve više istraživanja usmerava prema ispitivanju mogućnosti korišćenja vakcina pripremljenih od prečišćenih virusnih antigena ili pojedinih imunološki značajnih virusnih komponenti (subjedinica) koje sadrže ključne glikoproteinske HN i F antigene virusa, odgovorne za stimulisanje specifičnog imunološkog odgovora kod vakcinisanih životinja i oslobođene od infektivnih delova virusne čestice kao i balastnih proteina koji bi mogli delovati kao pirogeni (Milić i sar., 1996., Seal i sar., 2000., Panshin i sar., 2001.). Iz tih razloga su i naša istraživanja bila usmerena na ispitivanje strukturnih komponenti i nekih bioloških karakteristika soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti živine izolovanog iz golubova, a prvenstveno hemaglutinacionih aktivnosti i imunogenih svojstava njegovih subjedinica sa ključnim glikoproteinskim antigenima – hemaglutininsko neuraminidaznim (HN) i fuzionim (F) proteinima radi pripremanja subjedinične vakcine.

MATERIJAL I METODE

Sojevi virusa

Ispitivani soj virusa Newcastle bolesti živine, izolovan iz golubova je prethodno umnožavan u alantohorijalnim šupljinama kokošijih embriona starosti od 9 do 11 dana tokom perioda od 72 časa na temperaturi od 37°C. Pre ispitivanja strukturnih, hemaglutinacionih i imunogenih svojstava virusnih antigena izvršena je identifikacija izolovanog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti primenom lančane reakcije polimeraze – Reverse transcriptase PCR i Real-Time PCR sa sekvenciranjem nukleotida uz korišćenje specifičnih prajmera za F gen – MV1 i B2. Sekvenciranjem prvog dela F gena pomenutog soja virusa koji

je sadržavao 430 nukleotida (na osnovu pozicije nukleotida od 47 do 421) potvrđena je potpuna homologija (100%) sa sojem PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti koji pripada klasi II i genotipu I lentogenih sojeva virusa atipične kuge živine. Sukcesivnim pasažama virusnog antigena u kokošijim embrionima tokom perioda od mesec dana i sakupljanjem njihove alantoisne tečnosti sa umnoženim virusom, dobijena je dovoljna količina virusne suspenzije sa titrom virusa od $\log=10^{-8,9}$ EID₅₀/0,1 ml i hemaglutinacionim titrom od 512 HJ/0,1ml. Soj La Sota virusa Newcastle bolesti sadržan u komercijalnoj inaktivisanoj vakcini je korišćen u uporednom ispitivanju imunogenosti subjediničnih antigena soja PHY-LMV.42 navedenog virusa na eksperimentalnoj živini.

Koncentrisanje i prečišćavanje glikoproteinskih antigena virusa Newcastle bolesti

Sakupljena alantoisna tečnost poreklom od inokulisanih kokošijih embriona koja je sadržavala umnoženi soj PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti je prvo prečišćavana centrifugovanjem na 3.200 o/min tokom vremenskog perioda od 30 minuta, posle čega je virusna suspenzija tretirana sa istom zapreminom rastvora 12 g/dl polietilen glikola - PEG 8000 (Sigma Aldrich GmbH, Germany) u prisustvu 0,5 mol/l natrijum hlorida tokom 3 časa na temperaturi od 4°C i centrifugovana na 3.500 o/min tokom 10 minuta. Sakupljeni precipitati kompletnih virusnih čestica su zatim resuspendovani u podlozi za kulturu tkiva (Minimal essential medium - MEM with Earle's salts; PAA Laboratories GmbH, Austria) sa 2 g/dl fetalnog goveđeg seruma (Fetal bovine serum Gold; PAA Laboratories GmbH, Austria). Uzorci resuspendovanih viriona od po 2 ml su prečišćavani metodom preparativnog ultracentrifugovanja u linearnim gradijentima gustine od 12-38 g/dl kalijum-natrijum tartarata u 0,2 mol/l fosfatnom slanom puferu (PBS) na 27.000 o/min tokom 2 časa. Posle sakupljanja iz gradijenata, prečišćeni virioni su tretirani sa 10% Triton-X-100 (Sigma Aldrich GmbH, Germany) tokom 25 minuta na temperaturi od 20°C, a zatim centrifugovani na 39.000 o/min tokom 1 časa radi izdvajanja virusnih subjedinica od nukleokapsida. Prečišćavanje suspenzije glikoproteinskih subjedinica virusa uz oslobađanje od deterdženta korišćenog za razgradnju viriona (Triton-X-100), vršeno je primenom jonoizmenjivača Amberlite XAD-2 (Sigma Aldrich GmbH, Germany).

Određivanje ukupne koncentracije proteina

Ukupna koncentracija proteina u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica navedenog soja virusa Newcastle bolesti je određivana metodom po Lowry i sar. (1951.), uz primenu folin-fenol reagensa.

Određivanje hemaglutinacionih aktivnosti prečišćenih viriona i glikoproteinskih subjedinica virusa

Hemaglutinacione aktivnosti prečišćenih viriona i virusnih subjedinica soja PHY-LMV.42 određivane su primenom metodom direktne hemaglutinacije u mikrotitracionim pločama (OIE, 2012.).

Određivanje prisustva glikoproteinskih antigena u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica

Dokazivanje prisustva virusnih glikoproteina (HN i F antigena) u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica vršeno je primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) sa referentnim poliklonskim imunim serumom i monoklonskim 7D4 serumom protiv antigena lentogenih vakcinalnih sojeva virusa Newcastle bolesti (Veterinary Laboratory Agency, UK). Prisustvo pomenutih antigena u ispitivanim uzorcima je dodatno potvrđeno testovima inhibicije hemolitičke aktivnosti i ćelijske fuzije na ćelijskoj liniji Vero posle aktivacije prečišćenih viriona i glikoproteinskih subjedinica pomenutog soja virusa sa 0,025 g/dl tripsin-versena u PBS i njihove neutralizacije navedenim imunim serumima.

Izdvajanje i vizuelizacija strukturnih komponenti prečišćenih viriona i virusnih subjedinica metodom SDS-PAGE

Biohemijska analiza strukturnih virusnih proteina u uzorcima kompletnih prečišćenih virusnih čestica kao i uzoraka izolovanih glikoproteinskih subjedinica je vršena primenom metode SDS-PAGE u diskontinuiranom puferskom sistemu po Laemmli (1970.) sa selektivnim bojenjem virusnih glikoproteina sa Šifovim reagensom (Sigma Aldrich GmbH, Germany) po Gordon (1983.). Pored toga, elektroforezirani uzorci kompletnih viriona i virusnih subjedinica su ispitivani i selektivnim bojenjem virusnih glikoproteina metodom „Stains-all” po Campbell i sar. (1983.). Kao

koelektroforezni markeri su korišćeni referentni uzorci koji su sadržavali proteine poznatih molekulskih masa od 250-10 kDa (Page Ruler plus Prestained protein Ladder – Thermo Scientific, USA).

Određivanje prisustva virusnih proteina u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica primenom metode tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS)

Determinacija virusnih proteina u uzorcima prečišćenih viriona i njihovih subjedinica vršena je i metodom tečne hromatografije kuplovanom sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) uz korišćenje HPLC instrumenta (Agilent 1200 Series) sa Zorbax Eclipse XDB C18 RRHT kolonom (150 x 4,6 mm i.d.; 1,8µm) i diodnim detektorom (DAD) udruženim sa 6210 Time-of-flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies). Mobilna faza se sastojala od 0,2% vodenog rastvora mravlje kiseline (rastvor A) i 100% acetonitrila (rastvor B) sa ispiranjem u gradijentu: 0-60 min 2-80% B, 60-61 min 2% B sa protokom od 0,35 ml/min.

Vakcine

Subjedinična vakcina je pripremljena od virusnih komponenti soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti rastvorenih u 0,1 mol/l fosfatnog slanog pufera (PBS) tako da su dobijeni imunogeni sa koncentracijama virusnih antigena od 0,022 i 0,011 mg po dozi vakcine od 0,5 ml i hemaglutinacionom aktivnošću od 256 i 128 HJ. Druga vakcina koja je korišćena u ogledima imunizacije je komercijalna inaktivisana vakcina PEST-OL pripremljena od inaktivisanog La Sota soja virusa Newcastle bolesti titra od 10^9 EID₅₀ virusnih antigena po dozi od 0,5 ml.

Ispitivanja imunogenosti pripremljene subjedinične vakcine

Posle određivanja hemaglutinacione aktivnosti prečišćenih virusnih subjedinica metodom direktne hemaglutinacije, ispitivana je njihova imunogenost u biološkom ogledu na ukupno 75 kokoši nosilja Tetra-SSL i 25 pilića Isa Brown uz izvođenje veštačke infekcije sojem Hertz 33 navedenog virusa.

Prvi deo ogleda imunizacije je sproveden na ukupno 32 Tetra-SSL kokoši seroronegativne na antigene virusa Newcastle bolesti, podeljenih u tri ogledne grupe od kojih su prve dve grupe od po 11 životinja,

intramuskularno (i/m) vakcinisane sa 0,022 mg i 0,011 mg prečišćenih virusnih subjedonica sa hemaglutinacionom aktivnošću od 256 HJ (prva grupa) i 128 HJ po dozi od 0,5 ml (druga grupa) i revakcinisane 14. dana ogleda, dok je treća grupa od 10 nevakcinisanih kokoši služila kao kontrola u ogledu.

Drugi deo ogleda imunizacije je vršen na četiri grupe od ukupno 43 Tetra-SSL kokoši nosilja uzetih iz proizvodnog procesa i seropozitivnih na antigene virusa Newcastle bolesti jer su ranije imunizovane protiv navedenog patogena i drugih virusa u skladu sa Programom mera zdravstvene zaštite životinja. Prve dve ogledne grupe od po 11 kokoši nosilja su i/m imunizovane subjediničnim vakcinama koje su sadržavale 256 HJ (prva grupa) i 128 HJ po dozi (druga grupa) kao što je prethodno opisano, dok je treća grupa od 11 kokoši i/m imunizovana dozama od 0,5 ml inaktivisane PEST-OL vakcine koja je sadržavala 10^9 EID₅₀ vakcinalnog soja La Sota u uljanom adjuvansu i revakcinisana 21-og dana ogleda, a četvrta kontrolna grupa od 10 kokoši nije podvrgnuta vakcinaciji.

Imunogena svojstva i zaštitni karakter niskih koncentracija vakcinalnog imunogena od 0,011 mg prečišćenih virusnih subjedonica po dozi od 0,5 ml potvrđeni su u ogledu izvršenom na 25 pilića Isa Brown, starosti od 14 dana, negativnih na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti. Prva grupa od 14 oglednih pilića je i/m vakcinisana dozama od 0,5 ml vakcine sa 128 HJ, revakcinisana posle 14 dana i i/m veštački inficirana dozama od po 200.000 EID₅₀ virulentnog soja Hertz 33 virusa Newcastle bolesti 28-og dana ogleda, dok je druga grupa od 11 nevakcinisanih pilića seronegativnih na antigene pomenutog virusa na isti način veštački inficirana prethodno navedenim virulentnim sojem virusa atipične kuge živine.

Uzorci krvnih seruma svih eksperimentalnih životinja su ispitivani na prisustvo i titar specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti metodom inhibicije hemaglutinacije (HI testom).

Za statističku analizu dobijenih rezultata ogleda imunizacije korišćene su neparametrijske statističke metode i to Kruskal-Wallis grupni test i Dunn's Multiple Comparison Test kao posthok test. Statistička analiza rađena je u statističkom paketu GraphPad Prism 5.

REZULTATI

Identifikacija vakcinalnog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti izvršena je primenom lančane reakcije polimeraze – Reverse transcriptase PCR i Real-Time PCR sa sekvenciranjem nukleotida uz korišćenje specifičnih prajmera za F gen – MV1 i B2. Sekvenciranjem prvog dela F gena izolovanog soja virusa koji je sadržavao 430 nukleotida (na osnovu pozicije nukleotida od 47 do 421) potvrđena je potpuna homologija (100%) sa sojem PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti koji pripada klasi II i genotipu I lentogenih sojeva navedenog virusa.

Ukupna koncentracija proteina u uzorcima koncentrisanih i prečišćenih viriona resuspendovanih u 0,2 mol/l PBS iznosila je 0,58 mg/ml sa značajnim hemaglutinacionim titrom od 4096 HJ/0,1 ml pri čemu su niske koncentracije virusnih subjedinica od 0,36 mg/ml takođe ispoljavale snažnu hemaglutinacionu aktivnost od 4096 HJ/0,1 ml što je određeno primenom testa direktne hemaglutinacije.

Navedene virusne subjedinice su razređene u 0,1 mol/l PBS u cilju pripreme imunogena sa hemaglutinacionim titrima od 256 i 128 HJ i ukupnim koncentracijama proteina od 0,022 i 0,011 mg po dozi vakcine od 0,5 ml.

Uzorci prečišćenih viriona soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti ispitivanog metodom SDS-PAGE i bojenih sa Coomassie Brilliant Blue sadržavali su 7 proteinskih frakcija molekulskih težina od oko 250, 77, 69, 58, 45, 41 i 11 kDa koje su odgovarale: velikom proteinu (L), hemaglutininsko-neuraminidaznom proteinu (HN), neaktivisanom prekursoru F proteina (F₀), F₁ proteinu, nukleokapsidnom proteinu (NP) i fosfoproteinu (P), matriksnom proteinu (M) i malom fragmentu F proteina (F₂). Uzorci elektroforeziranih virusnih subjedinica su sadržavali 5 proteinskih frakcija, među kojima su proteinske komponente molekulskih težina od 77, 69 i 58 kDa odgovarale HN, F₁ i F₀ proteinima. Uzorci prečišćenih viriona, elektroforezirani pod redukujućim uslovima sa Šifovim reagensom sadržavali su 3 glikoproteinske frakcije od 77, 58 i 11 kDa koje su odgovarale HN, F₁ i F₂ proteinima, dok su kod njihovih subjedinica utvrđena dva glikoproteina od 77 i 58 kDa koji su odgovarali HN i F₁ proteinima. Ove glikoproteinske frakcije u elektroforeziranim uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica ispitivanog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti su se obojile u ružičasto. Odsustvo

virusnih nukleokapsida sa infektivnom ribonukleinskom kiselinom virusa (RNK) u uzorcima virusnih glikoproteinskih subjedinica je potvrđeno metodom SDS-PAGE sa selektivnim bojenjem virusnih proteina metodom „Stains-all”. Pored toga, broj proteinskih frakcija i vrednosti njihovih molekulskih masa u uzorcima elektroforeziranih prečišćenih viriona i virusnih subjedinica obojenih metodom „Stains-all” je bio isti kao i kod uzoraka ispitivanih metodom SDS-PAGE obojenih sa Coomassie Brilliant Blue. Proteinske frakcije utvrđene u uzorcima kompletnih virusnih čestica koje su imale molekulske mase veće od 78.000 Da, kao što su frakcije od 107.150, 131.800 i 151.600 Da, nisu ustanovljene u uzorcima prečišćenih virusnih subjedinica. Prečišćene virusne subjedinice koje su sadržavale dva glikoproteina molekulskih težina od 77 i 58 kDa koji su odgovarali HN i F₁ proteinima pomenutog virusa, zajedno sa proteinskim komponentama od 69, 45 i 41 kDa čije su molekulske težine odgovarale F₀, P i M proteinima, korišćene su za pripremanje subjedinične vakcine.

Subjedinčna vakcina za izvođenje ogleda imunizacije na eksperimentalnim kokošima i pilićima je pipremljena od prečišćenih virusnih komponenti soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti koji su sadržavali imunološki značajne glikoproteinske molekule – hemaglutininsko-neuraminidazni i fuzioni protein. Identifikacija glikoproteinskih antigena izvršena je metodama SDS-PAGE, hemaglutinacije (HA testom) i inhibicije hemaglutinacije (HI testom).

Metoda tačne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) je korišćena za proteomsku analizu i karakterizaciju strukturnih proteina kompletnih prečišćenih viriona soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti i njegovih virusnih subjedinica. Na osnovu hromatograma dobijenih metodom LC ESI-TOF-MS/MS, izvršena je karakterizacija uzoraka prečišćenih viriona i izolovanih virusnih subjedinica ispitivanog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti. Šest glavnih proteinskih traka je utvrđeno u uzorcima prečišćenih viriona, dok je 5 proteinskih traka ustanovljeno u uzorcima prečišćenih virusnih subjedinica. Primenom ove metode, maseni spektri proteina su određivani na osnovu intenziteta signala, na osnovu čega su utvrđeni maseni spektri glavnih glikoproteinskih traka od 77.266 i 50.950 Da. Molekulske težine utvrđenih proteinskih komponenti za HN protein su se kretale od 71-77 kDa, za F protein od 59-69 kDa, dok su za M protein

iznosile od 37-43 kDa. Nukleokapsidni protein (NP), ustanovljen u uzorcima kompletnih virusnih čestica, nije bio prisutan u uzorcima prečišćenih virusnih subjedinica. Molekulska težina NP proteina u uzorcima prečišćenih viriona je iznosila oko 49 kDa. Molekulske težine proteinskih komponenti utvrđenih kod kompletnih prečišćenih viriona i virusnih subjedinica navedenog soja virusa, utvrđene tečnom hromatografijom kuplovanom sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) su se minimalno razlikovale od molekulskih težina pomenutih proteina ustanovljenih metodom SDS-PAGE u diskontinuiranom puferskom sistemu.

Niske koncentracije napred navedenih glikoproteinskih antigena su stimulisale sintezu specifičnih HI antitela u organizmu svih vakcinisanih kokoši iz prve i druge ogledne grupe koje su pre početka imunizacije bile seronegativne na antigene virusa Newcastle bolesti. Srednji geometrijski titri (GMT log 2/25 μ l) utvrđeni u uzorcima krvnog seruma prve i druge grupe eksperimentalnih kokoši iznosili su 14-og dana od vakcinacije 4,95 i 4,14; 21-og dana 7,86 i 6,05; 28-og dana 8,18 i 7,27, a 35-og dana 5,9 i 5,73. Statističkom analizom je utvrđeno da između vrednosti srednjih geometrijskih titara specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti (GMT log 2/25 μ l) kod prve dve grupe vakcinisanih kokoši u navedenim vremenskim intervalima ne postoje značajne razlike ($p>0,05$).

Vrednosti srednjih geometrijskih titara specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti (GMT log 2/25 μ l) utvrđene u krvnom serumu imunizovanih kokoši iz prve i druge ogledne grupe uzetih iz proizvodnog procesa su neposredno pre vakcinacije iznosili 1,18 i 2,27; posle 14 dana od vakcinacije 4,32 i 4,73; 21-og dana ogleda 6,59 i 6,14; 28-og dana 7,45 i 8, a 35-og dana 4,84 i 6,82. Vrednosti srednjih geometrijskih titara specifičnih HI antitela u krvnim serumima treće eksperimentalne grupe kokoši nosilja imunizovanih sa po 0,5 ml inaktivisane PEST-OL vakcine bili su 2,31 neposredno pre vakcinacije; 14-og dana ogleda 5,18; 21-og dana 8,35 i 35-og dana 6,35, dok su uzorcima krvnog seruma četvrte kontrolne grupe nevakcinisanih kokoši iznosili 3,50 pre početka ogleda; 14-og dana ogleda 2,9; 21-og dana 2,15; 28-og dana 1,35 i 35-og dana 0,5. Statističkom analizom rezultata dobijenih posle imunizacije seropozitivnih Tetra-SSL kokoši utvrđeno je da ne postoje signifikantne razlike ($p>0,05$) između srednjih geometrijskih vrednosti titara HI antitela među tri ogledne grupe kokoši vakcinisanih subjediničnim imunogenom

od 256 i 128 HJ i inaktivisanom vakcinom PEST-OL sa uljanim adjuvansom.

Grupa od 14 eksperimentalnih pilića Isa Brown i/m vakcinisanih i revakcinisanih virusnim subjedinicama od 128 HJ po dozi vakcine od 0,5 ml je u potpunosti preživela ogled veštačke infekcije virulentnim sojem napred navedenog patogena (100%), bez pojave ikakvih kliničkih simptoma oboljenja, dok su svi nevakcinisani pilići uginuli za 3-5 dana od veštačke infekcije. Vrednosti srednjih geometrijskih titara HI antitela ustanovljene u uzorcima krvnog seruma vakcinisanih pilića su 14-og dana posle vakcinacije bili 3,4; 21-og dana ogleda 4,25; 28-og dana 5,4 i 35-og dana 5,3.

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Ispitivanja Panshin i sar. (2001.), Kim i sar. (2003.), Römer-Oberdorfer i sar. (2003.), Ren i sar. (2012.) omogućila su sticanje kompletnog uvida u kompleksnu strukturu i biološke aktivnosti komponenti virusa Newcastle bolesti živine, što je predstavljalo osnovu za naša istraživanja strukturnih karakteristika, hemaglutinacionih aktivnosti i imunogenosti prečišćenih glikoproteinskih subjedinica lentogenog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti radi pripremanja efikasnog i neškodljivog vakcinalnog antigena, potpuno oslobođenog od infektivne virusne RNK i nestrukturnih proteinskih komponenti. Veoma niske koncentracije virusnih subjedinica od svega 0,36 mg/ml su posle procesa prečišćavanja ispoljavale izraženu hemaglutinacionu aktivnost od 4096 HJ/0,1 ml što je omogućilo njihovo korišćenje u ogledima imunizacije na eksperimentalnoj živini. Rezultati ispitivanja proteinskih frakcija virusnih subjedinica metodom SDS-PAGE uz korišćenje napred opisanih bojenja elektroforeziranih uzoraka virusnih proteina i metodom tečne hromatografije kuplovanom sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) su potvrdili da iste sadrže ključne HN i F glikoproteinske antigene molekulskih masa od 77 i 58 kDa i omogućili sticanje potpunog uvida u njihovu strukturu. Niske koncentracije glikoproteinskih subjedinica sa hemaglutinacionim aktivnostima od 256 i 128 HJ po dozi vakcine od 0,5 ml stimulisale su snažan humoralni imunološki odgovor kod svih vakcinisanih i revakcinisanih kokoši nosilja, dok su imunizovanim pilićima Isa Brown omogućile potpunu zaštitu od veštačke infekcije virulentnim sojem Hertz 33 virusa Newcastle bolesti živine. Na osnovu rezultata navedenih

ispitivanja može se zaključiti da se prečišćene virusne subjedinice lentogenog soja PHY-LMV.42 virusa atipične kuge živine, oslobođene nukleokapsida (NP) sa virusnom ribonukleinskom kiselinom (RNK), velikog proteina (L) i manjeg fragmenta fuzionog proteina (F₂) mogu koristiti za pripremanje nove formulacije imunogena za spovođenje vakcinacije živine protiv virusa Newcastle bolesti.

LITERATURA

1. Alexander D J, Newcastle disease and other avian paramyxoviruses, *Rev Sci Tech*, 19 (2000) 443.
2. Arora P, Lakhchaura D B & Garg K S, Evaluation of immunogenic potential of 75 kDa and 56 kDa proteins of Newcastle disease virus (NDV), *Ind J Exp Biol*, 48 (2010) 889.
3. Campbell K P, MacLennan D H & Jorgensen A O, Staining of the Ca²⁺ - binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all", *J Biol Chem*, 258 (1983) 11267.
4. Chaturvedi U, Kalim S, Desai G, Ratta B, Kumar R, Ravindra P V, Kumar S, Dash B B, Tiwari S, Sahoo A P & Tiwari A K, Development and in vitro characterization of a bivalent DNA containing HN and F genes of velogenic Newcastle disease virus, *Indian J Exp Biol*, 49 (2011) 140.
5. Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S, Newcastle disease virus: Current status and our understanding, *Virus Res*, 184 (2014) 71.
6. Gordon A H, Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels, in *Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology* (Elsevier, New York) 1983, 1.
7. Homhuan A, Prakongpan S, Poomvises P, Maas R A, Crommelin D J A, Kersten G F A, Jiskoot W, Virosome and ISCOM vaccines against Newcastle disease: preparation, characterization and immunogenicity, *Eur J Pharm Sci*, 22 (2004) 459.
8. Kim S, Wanasen N, Paldurai A, Xiao S, Collins P L & Samal S K, Newcastle disease virus fusion protein is the major contributor to protective immunity of genotype-matched vaccine, *PL O*, 8 (2003) e74022.
9. Laemmli U K, Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680.
10. Lowry O H, Rosenbraugh N J, Farr A L & Randall R J, Protein measurement folin-phenol reagent, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265.

11. Maas A R, Komen M, van Diepen M, Oei L H & Claassen M T J I, Correlation of hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated Newcastle disease vaccines, *Vaccine*, 21 (2003) 3137.
12. Milić N, Gadjanski-Omerović G, Ašanin R, Marković B, Palić T, Simonović Lj, Rašić Z, Krnjaić D, Crvak B & Milisavljević S, Examination of the immunogenicity of experimental subunit vaccine against Newcastle disease virus, *Acta Veterinaria*, 46 (1996) 307.
13. Newcastle disease, in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014* (OIE) 2012, 561.
14. Panshin A, Shihmanter E, Weisman Y, Örvell C, Kydyrmanov A, Sayatov M, Asanov N, Nyaga P N, Kasiiti J L, Macharija M J & Lipkind M, The comparative antigenic characterization of Newcastle disease virus strains isolated in Kenya and Kazakhstan, *Comp Immunol, Micr & Inf Dis*, 24 (2001) 21.
15. Ren X, Xue C, Kong Q, Zhang C, Bi Y & Cao Y, Proteomic analysis of purified Newcastle disease virus particles, *Prot. Sci*, 1 (2012) 10.
16. Römer-Oberdorfer A, Werner O, Veits J, Mebastian T & Mettenleiter TC, Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity, *J Gen Virol*, 84 (2003) 3121.
17. Roth J A, Mechanistic bases for Adverse Vaccine Reactions and Vaccine Failures, *Adv Veter Med*, 41 (1999) 681.
18. Seal S B, King J D & Sellers S H, The avian response to Newcastle disease virus, *Dev Comp Immunol*, 24 (2000) 257.
19. Tanabayashi K & Compans R W, Functional interaction of paramyxovirus glycoproteins: identification of a domain in Sendai virus HN which promotes cell fusion, *J Virol*, 70 (1996) 6112.

**SKRINING, DIJAGNOSTIKA I MONITORING VIRUSNIH
INFEKCIJA U TRUDNOĆI
SCREENING, DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF VIRAL
INFECTIONS IN PREGNANCY**

Maja Čupić

Univerzitet Beograd, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Perinatalne virusne infekcije nastaju u toku graviditeta, ali se ne mogu zanemariti ni infekcije nastale neposredno pre koncepcije. Aktivne virusne infekcije mogu da se prenesu na plod tokom cele trudnoće. Takođe, prisustvo virusa u vaginalnim i/ili cervikalnim sekretima usled aktivne virusne replikacije u vreme porođaja, predstavlja poseban rizik za nastanak infekcije novorođenčeta, ali i u neposredno ranom postnatalnom periodu putem majčinih sekreta i/ili ekskreta. Ishod virusne infekcije u trudnoći predstavlja interakciju više činilaca kao što su: virus-domaćin odnosno majka-plod. Vrsta virusa, dužina eksponiranosti kao i veličina inokuluma, individualna osetljivost kao i imunski odgovor trudnice koji se razlikuje od imunskog odgovora iste osobe van perioda graviditeta, determinišu ishod infekcije u trudnoći. Nepostojanje ili nizak titar anti virusnih antitela u vreme porođaja, prevremeno pucanje plodovih ovojnica ili postojanje trauma na koži neonatusa kod "fetal scalp monitoring-a" kao i nezrelost ploda, takođe su razlozi za nastanak infekcija neonatusa.

Najčešći i najvažniji virusi uzročnici infekcija u trudnoći koji mogu biti preneseni na plod su: *Cytomegalovirus* (CMV) Herpes simplex virus tip 1 i 2 (HSV 1,2), *Varicella Zoster virus* (VZV) [6], *Rubella virus*, Parvovirus B19 (B19) Hepatitis B i C virus (HBV, HCV), HIV i drugi (koksakivirusi, enterovirusi, adenovirusi, humani papiloma virusi i dr.). U daljem tekstu će biti pomenuti samo najvažniji virusi za nastanak perinatalnih infekcija.

Cytomegalovirus

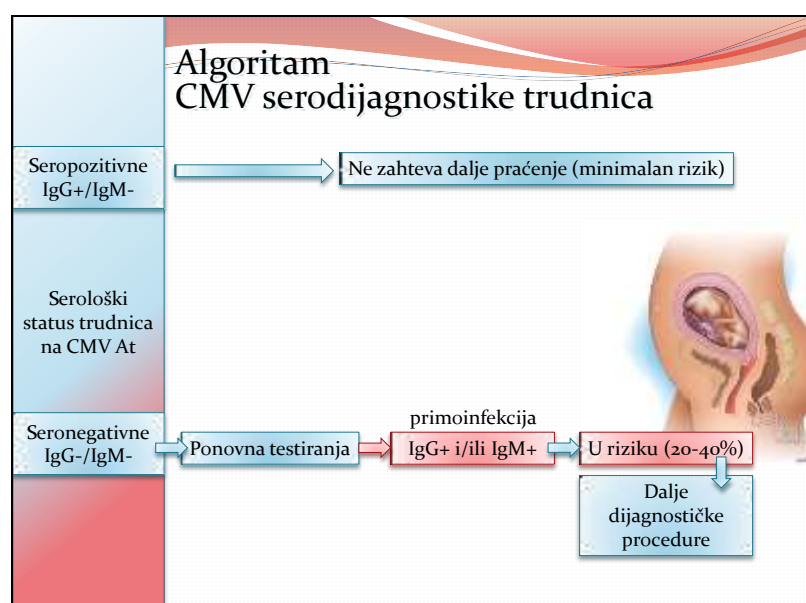
Cytomegalovirus (CMV) je široko rasprostranjen virus niske kontagioznosti sa svetskom seroprevalencom od 40-90%. CMV je najčešći i najznačajniji uzročnik virusnih infekcija u trudnoći. Perinatalna infekcija može da nastane u toku primarne ili rekurentne CMV infekcije

majke. S obzirom na visoku učestalost ovog virusa u populaciji, infekcije u trudnoći su češće posledica CMV reaktivacija nego primarne infekcije. CMV infekcija predstavlja rizik za plod tokom cele trudnoće. Primarna CMV infekcija se sreće kod 1-4% trudnica kod kojih čak u 30 -70% dolazi do prenošenja infekcije *in utero* sa različitim ishodima koji koreliraju sa gestacijskom starosti trudnoće. Kongenitalna CMV infekcija prisutna je kod 0,1-1% neonatusa od kojih oko 10% ima sptomatsku infekciju, odnosno oko 5% novorođenčadi pokazuje tipične simptome CMV inkluzione bolesti. Ovo je multisistemsko oboljenje koje je praćeno zastojem u intrauterinom rastu, hepatosplenomegalijom, trombocitopenijom, cerebralnim kalcifikacijama, horioretinitisom, mikrocefalijom, strabizmom dr. Oko 85-90% inficiranih fetusa nema simptome na rođenju, međutim kod oko 10% dece, određene sekvele CMV kongenitalne infekcije će se razviti u periodu ranog detinjstva kao što su: mentalna retardacija, cerebralne disfunkcije, gluvoća ili slepilo.

Pored infekcije *in utero*, CMV transmisija koja može da nastane tokom porođaja kroz inficirani porođajni kanal majke ili postanatalno najčešće dojenjem ili salivom, odgovorna je za nastanak infekcija neonatusa.

Smatra se da su funkcija i zrelost placente najvažniji činioci koji determinišu ishod CMV infekcije u trudnoći. Poznato je da infekcija placente postoji i kod infekcija koje se prenose ali i onih CMV infekcija koje neće biti prenesene na plod. Postojanje specifične imunosti majke u toku rekurentne CMV infekcije ne može da spreči transmisiju virusa na plod, mada su kliničke manifestacije oboljena blaže, nego kada je u pitanju primarna CMV infekcija trudnice. Ovo ukazuje da antitela ne mogu da spreče hematoplacentarnu transmisiju virusa, ali sigurno da smanjuju njegovu virulentnost. Brojna istraživanja su pokazala da je titar specifičnih anti CMV antitela kod trudnica sa aktivnom CMV infekcijom (primarnom ili reaktivacijom) kod koji dolazi do prenosa infekcije na plod vrlo visok, što se može objasniti dugotrajnom antigenskom stimulacijom ili većom virulencijom CMV. Takođe brojna ispitivanja ćelijske imunosti kod trudnica inficiranih CMV su pokazala da je postoji depresija proliferativnog odgovora limfocita na specifične CMV antigene kod majki koje rađaju decu sa kongenitalnom infekcijom. Upravo se smatra da ovaj defekt specifične celularne imunosti može da bude odgovoran za tranplacentarnu transmisiju CMV u toku graviditeta.

Laboratorijska dijagnostika podrazumeva skup seroloških i molekularnih testova za otkrivanje i monitoring CMV infekcije majke /fetusa /neonatusa. Prenatalni serološki skrining majke procenjuje rizik od CMV infekcije u trudnoći. Od serološkog nalaza majke zavise dalji laboratorijski postupci praćenja CMV infekcije i majke i ploda, osetljivijim, egzaktnijim i pouzdanijim metodama, kao što su PCR i RTQ PCR.



Herpes simplex virus

Herpes simplex virus tip 1 i 2 (HSV 1, 2) su široko rasprostranjeni herpes virusi, koji izazivaju asimptomatske ili subkliničke infekcije kod imunokompetentnih osoba, dok kod imunokompromitovanih pacijenata, u trudnoći i kod neonatusa, mogu da uzrokuju teške, klinički manifestne nekada i smrtonosne infekcije. Genitalni herpes mogu da uzrokuju oba tipa HSV sa gotovo jednakom učestalošću, što znači da oba tipa virusa predstavljaju rizik za trudnoću, odnosno nastanak neonatalnog herpesa, kao jednu od najtežih kliničkih manifestacija. Aktivna genitalna HSV infekcija češće se javlja kod trudnica u odnosu na negravidne žene [3:1]. Ona može biti rezultat primarne ili češće reaktivacije latentne HSV infekcije, ali obe nose rizik da budu prenesene na plod. Neonatalna HSV infekcija može da nastane:

- ***In utero*** ~ 5% HSV infekcija neonatusa

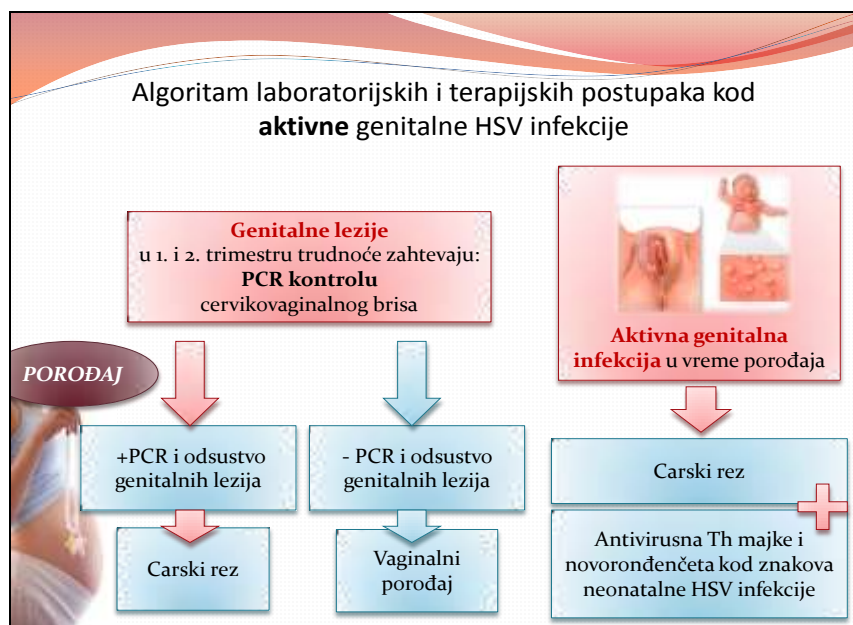
- *Intrapartalno* ~ 85%-90% HSV infekcija neonatusa
- *Postpartalno* ~ 5-10% tokom ranog postnatalnog perioda

Kongenitalna HSV infekcija je retka i javlja se kod 4/100000 novorođene dece sa visokom stopom smrtnosti oko 50%. Može da nastane transplacentno ili ascendentno–transcervikalno, tokom prvih 20 nedelja trudnoće sa sledećim ishodima: spontani pobačaja, intrauterina smrt ploda, prevremeni porođaj, kongenitalne abnormalnosti, infekcije CNS, neurološka oštećenja, intrakranijalne kalcifikacije, mikroftalmija, horiorretinitis i dr. Primarna genitalna HSV u poslednjem trimestru trudnoće, a posebno u terminu porođaja, nosi veoma visok rizik od nastanka teških formi neonatalne HSV infekcije.

Ipak, 85-90% neonatalnih HSV infekcija su posledica intrapartalne transmisije, češće uzrokovane HSV tipom 2. Tokom vaginalnog porođaja novorođenče dolazi u kontakt sa infektivnim genitalnim sekretima majke čak i u odsustvu vidljivih lezija. Takođe, duža izloženost virusu (> od 4 časa po pucanju plodovih ovojnica), povećava rizik za nastanak HSV infekcije novorođenčeta.

HSV infekcija neonatusa se javlja u 3 klinička oblika: infekcija kože, očiju i usta (engl. *SEM diseases*), čini 45% svih neonatalnih HSV infekcija i ima relativno nisku stopu mortaliteta; neonatalni HSV encefalitis predstavlja najčešću manifestaciju neonatalnog herpesa koji može ali ne mora da nastaje progresijom SEMa. Javlja kod 30% HSV inficiranih neonatusa koji može posebno ukoliko terapija nije započeta pravovremeno da progredira u multiorgansku bolest tj. diseminovanu formu neonatalne HSV infekcije, koja zahvata visceralne organe: pluća, jetru, žlezde, mozak i praćena je teškim sistemskim mukokutanim promenama i čak i sa Th ima visoku stopu letaliteta.

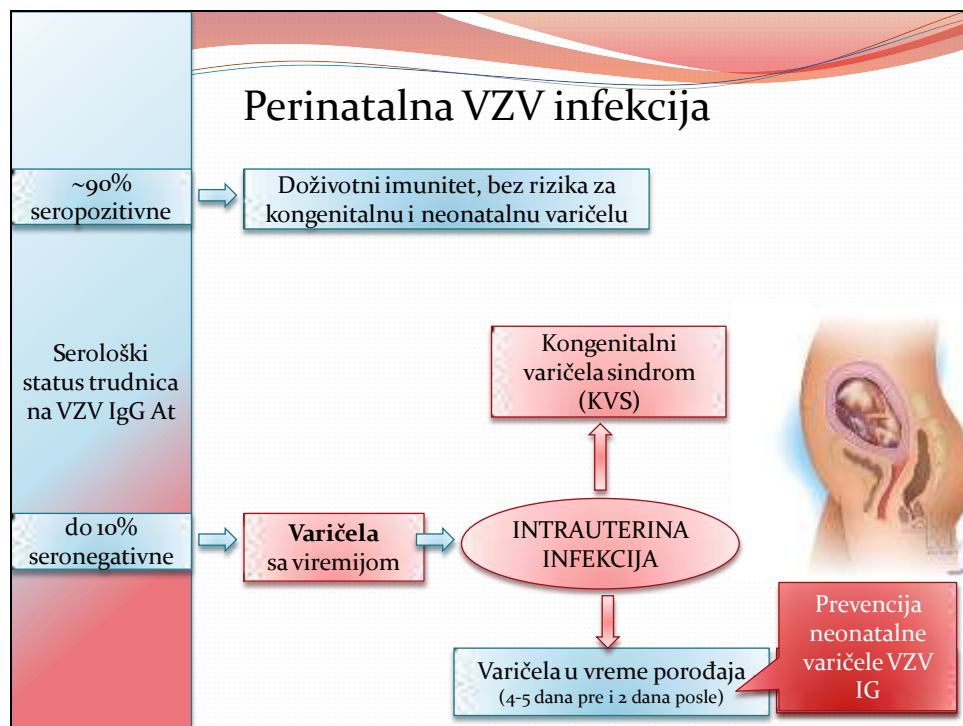
Molekularne metode predstavljaju metode izbora u dijagnostici genitalne HSV infekcije majke, odnosno novorođenčeta.



Varicella Zoster Virus

Varicella Zoster (VZV) je još jedan herpes virus koji je važan uzročnik teških formi VZV infekcija kod imunokompromitovanih pacijenata odnosno može da uzrokuje neonatalnu varičelu. VZV je ubikvitaran, visoko kontagiozan virus, tako da >90% populacije ima specifičan VZV imunitet do odraslog doba. Virus u primarnoj infekciji uspostavlja varičelu, dok je Herpes zoster reaktivacija latentne VZV infekcije. Varičela majke u prvoj polovini trudnoće do perioda 20-24. nedelje je često teška sistemska infekcija udružena sa komplikacijama kao što je pneumonija. Varičela kod 10% inficiranih trudnica je rizik za nastanak infekcije *in utero* transplacentarnom transmisijom virusa. Takva infekcija ploda poznata je kao kongenitalni varičela sindrom (KVS), koga odlikuju CNS abnormalnosti, promene na kozi u vidu generalizovane vezikulozne ospe, mišićno koštani deformiteti, neurološka oštećenja i dr.. Ipak najveći rizik za nastanak neonatalne varičele 20-50%, predstavlja infekcija majke u vreme porođaja i to 5 dana pre i 2 dana posle porođaja, kada novorođenče usled izloženosti virusu može da dobija tešku formu varičele u vidu VZV encefalitisa.

Oko 5% trudnica nema specifična anti VZV antitela i u riziku je od nastanka primarne VZV infekcije u trudnoći, a time da infekciju prenese na plod/neonatus. Kod dijagnostički komplikovanih slučajeva varicele majke, metoda za dokazivanje je PCR, mada i serološko testiranje majke može da bude od značaja (serokonverzija ili nalaz IgM VZV antitela). Uzorci za dokazivanje infekcije kod ploda su amnionska tečnost odnosno krv fetusa, u kojima se isključivo PCR dokazuje VZV DNK. Kod sumnje na neonatalne varicele davanje VZV IG može da ima protektivni značaj odnosno modifikuje tok bolesti i težinu kliničke slike VZV neonatalne infekcije. Najefikasniji vid prevencije varicele je vakcinacija, kojom se obezbeđuje prevencija varicele majke u trudnoći odnosno neonatalne varicele



ZAKLJUČAK

Praćenje virusnih infekcija u trudnoći ima za cilj:

- rano otkrivanje infekcije,
- unapređenje laboratorijskih postupaka za prenatalnu i postnatalnu dijagnostiku,

- prognozu i monitoring pre/postnatalnih virusnih infekcija,
- pravoremeni neonatalni tretman.

Literatura

1. Ville Y, Leruez-Ville M. Managing infections in pregnancy. *Curr Opin Infect Dis.* 2014; 27:251-257.
2. Manicklal S., Vincent C. E., Lazzarotto T., Boppana S. B., Guptab R. K. The "Silent" Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26:86–102
3. De Vries J.J.C., Van Zwet E.W., Dekker F.W., Kroes A.M., Verkerk P.H., Vossen A.C.M. The apparent paradox of maternal seropositivity as a risk factor for congenital cytomegalovirus infection: a population-based prediction model. *Rev. Med. Virol.* 2013; 23: 241–249.
4. Mussi-Pinhata M.M., Yamamoto A.Y., Moura Brito R.M., et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis.* 2009; 4: 522–528
5. Khare M., Sharland M., Manyonda I., Rice P., Bland J.M., Griffiths P. Use of serial maternal urine cytomegalovirus PCR to detect primary CMV infection in seronegative pregnant women. *J Virol Methods.* 2004; 119(1): 31–35.
6. Hutto C. Congenital and Perinatal Infections: *A Concise Guide to Diagnosis.* Humana Press Inc. 2006. Totowa, New Jersey
7. Upton A. D, Robinson J.L. Prevention and management of neonatal herpes simplex virus infections. *Paed Child Health.* 2014;19:201-06.
8. Gardella C., Brown Z.A. Managing genital herpes infections in pregnancy. *Clev Clin J Med.* 2007; 74 : 217-224.
9. Frederick DM., Bland D., Gollin Y. Fatal disseminated herpes simplex virus infection in a previously healthy pregnant woman. A case report. *J Reprod Med.* 2002; 47:591–596.
10. Sauerbrei A., Wutzler P. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 2: Varicella-zoster virus infections. *Med Microbiol Immunol.* 2007; 196:95-102
11. Sauerbrei A., Wutzler P. Neonatal varicella. *J Perinatol.* 2001; 21:545-549

ULOGA GENETIČKE VARIJABILNOSTI HBV U PATOGENEZI FULMINANTNOG HEPATITISA

Ivana Lazarević

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju

UVOD

Hepatitis B virusna (HBV) infekcija predstavlja još uvek svetski zdravstveni problem. Procenjuje se da se kod oko 2 milijarde ljudi mogu naći dokazi prethodne infekcije ovim virusom, a da oko 350 miliona ljudi širom sveta ima hroničnu infekciju. Godišnja smrtnost od posledica hronične infekcije kao što su ciroza jetre i hepatocelularni karcinom iznosi oko 1-2 miliona.

HBV infekcija izaziva čitav spektar kliničkih manifestacija – od asimptomatske akutne i hronične infekcije i asimptomatskog nosilaštva virusa do simptomatskog akutnog hepatitisa (uključujući i fulminantni) i hroničnog hepatitisa sa kasnim posledicama- cirozom i hepatocelularnim karcinomom.

Fulminantni hepatitis (FH) ili kako se još naziva akutna (fulminantna) isuficijencija jetre, se definiše kao akutni hepatitis koji se komplikuje pojavom akutnog ozkazivanja jetre sa hepatičnom encefalopatijom koja se pojavljuje u roku od najviše 8 nedelja nakon početka bolesti, kod pacijenta sa prethodno zdravom jetrom[1]. Smrtnost od ovog oblika akutnog hepatitisa kreće se od 50-90% [2-4]. Najčešći uzročnici FH su virusi, zatim predoziranje pojedinim lekovima (najčešće paracetamolom), idiosinkratska reakcija na lekove (tetraciklini, troglitazon), prekomerni unos alkohola, ingestija toksina (najčešće gljiva) i metabolički poremećaji. U oko trećine slučajeva uzrok FH ostaje nepoznat. Hepatitis A virus (HAV) je ređe uzročnik FH (kod 1/1000 slučajeva, pretežno mlađih osoba) od HBV koji je najčešći virusni uzročnik FH (oko 1:100 slučajeva) [2,5].

Poznato je da na ishod HBV infekcije utiče kompleksan odnos domaćina i virusa, pre svega sposobnost imunskog odgovora da na pravilan način odreaguje i dovede do eliminacije virusa. Ipak, u poslednje dve decenije

rezultati istraživanja ukazuju da biološke osobine virusa, pre svega genetička varijabilnost, mogu da imaju ulogu u toku i ishodu HBV infekcije. Brojne studije prikazuju povezanost pojedinih genotipova i subgenotipova HBV, kao i mutacija u različitim regionima genoma sa pojavom fulminantnog hepatitisa. Posebno se ističe uloga onih genetskih faktora koji utiču na pojačanu replikativnu sposobnost virusa ili koji za posledicu imaju snažniji imunski odgovor domaćina[6].

Stopa spontanih mutacija HBV je daleko najveća među DNK virusima. Genetička varijabilnost ovog virusa je na prvom mestu posledica ključne uloge koju reverzna transkriptaza ima u njegovom životnom ciklusu, pošto ovom enzimu nedostaje sposobnost ispravljanja slučajno nastalih grešaka[7]. Osim toga, veliki obim replikacije HBV (proizvodnja novih viriona može da dostigne i 1011 viriona/dan), povećava verovatnoću nastajanja grešaka.

UTICAJ MUTACIJA U CORE PROMOTOR I PRECORE REGIONU NA RAZVOJ FULMINANTNOG HEPATITISA

Danas je širom sveta poznat fenomen tzv. "HBeAg-negativnog hepatitisa" koji se može razviti u toku hronične HBV infekcije, a koji je posledica selekcije mutacija u core promotor regionu (eng. basal core promotor – BCP) i/ili precore regionu (Pre-C). Tipično se otkriva mutacija G1896A u Pre-C regionu koja dovodi do nastanka preuranjenog stop kodona i prestanka sinteze HBeAg. U BCP regionu najpoznatija je dvostruka mutacija - T1762/A1764 koja je odgovorna za smanjenu sintezu precore iRNK čime dovodi do smanjenja, a zatim i prestanka sinteze HBeAg[8].

Obe grupe mutacija i u BCP i u Pre-C regionu često su opisivane u izolatima pacijenata sa fulminantnim hepatitisom[9-13]. Postoji puno dokaza da su mutacije u BCP regionu odgovorne za smanjenje sinteze precore iRNK, ali postoje i pretpostavke da se u prisustvu ovih mutacija sinteza pregenomske RNK ne menja ili čak povećava[14]. Takođe, misli se da HBeAg inhibira ekapsidaciju pregenoma i da njegov nedostatak pojačava replikaciju HBV[15]. S druge strane, postoje indicije da precore mutacija G1896A stabilizuje signal za enkapsidaciju što takođe promoviše replikaciju virusa[8]. Pojačana replikativna sposobnost BCP i Pre-C mutanata dokazana je i in vitro[12,16], a zna se da se replikativna

aktivnost povećava ukoliko su prisutne i dodatne BCP mutacije (T1753C, C1766T, T1768A)[16].

S druge strane, poynato je da je in vivo eliminacija inficiranih ćelija efikasnija u odsustvu ili smanjenomm prisustvu HBeAg, verovatno zato što ovaj antigen služi kao neka vrsta "mamca" koja štiti ćelije od imnskog odgovora. U odsustvu HBeAg, dolazi do snažnog odogovora citotoksičnih T limfocita i do ozbiljnih oštećenja parenhima jetre što je sve osnov za razvoj FH[17].

Osim navedenog, za razvoj fulminantne forme HBV infekcije okrivljena je i mutacija A2339G koja dovodi do jake ekspresije kompletnog core proteina za koga se misli da deluje kao trans-aktivator koji pokreće HBV replikaciju[18]. Postoje indicije da mutacije A1762T/G1764A, G1862T, and G1896A zajedno utiču na retenciju core čestica i DNK povezanih sa core česticama u jedru i citoplazmi inficiranih hepatocita što za posledicu ima pojačanu replikaciju virusa i razvoj FH[19]. Osim toga, postoje izveštaji i da se kod pacijenata sa FH češće otkrivaju insercije i delecije u precore regionu za koje je in vitro pokazano da pojačavaju replikaciju virusa[20].

UTICAJ MUTACIJA S GENA NA RAZVOJ FULMINANTNOG HEPATITISA

S region genoma je odgovoran za sintezu tri površinska proteina koja čine spoljašnji omotač HBV – velikog (L) koji je kodiran sa kompletnog Pre-S1/Pre-S2/S regiona, srednjeg (M) koji je kodiran sa Pre-S2/S regiona i malog (S) koji je kodiran samo sa S regiona.

Izolati sa mutacijama u S ili još češće Pre-S regionu su povezivani sa različitim teškim oblicima akutnog i hroničnog hepatitisa, uključujući fulminantni hepatitis, firbozirajući holestatski hepatitis i cirozu[21]. U stvari, istraživanja su pokazala da su Pre-S1 i Pre-S2 regioni najvarijabilniji u celom genomu HBV. Varijante virusa koje nisu sposobne da sintetišu srednji (M) protein se najčešće selektuju u toku infekcije[22,23], verovatno zato što M protein nije neophodan za formiranje viriona, sekreciju i infektivnost virusa, za razliku od L i S proteina. Pokazano je da je transmisija HBV Pre-S mutanata, posebno onih koji nisu sposobni za proizvodnju M proteina, povezana sa

slučajevima FH[24]. Ovi mutanti su pokazivali dvostruku mutaciju u start kodonu za Pre-S2 region koja je sprečavala sintezu odgovarajućeg proteina –M. Pošto je odgovor T i B limfocita na M protein važan događaj u imunskom odgovoru na HBV infekciju, pretpostavlja se da odsustvo ovog proteina može imati za posledicu neefikasnu neutralizaciju virusa i sklonost ka težem oštećenju jetre koje odgovara FH. Osim toga, odsustvo M proteina ima za posledicu nakupljanje viška L proteina, što je povezano sa FH kod transgenih miševa in vitro[25]. Drugi autori[26] navode da su sa slučajevima FH povezane mutacije u S regionu, uključujući G145R – poznatu mutaciju koja je povezana sa izbegavanjem protektivnog efekta vakcinacije, a koje utiču na retenciju površinskih proteina u ER.

UTICAJ PRIRODNE VARIJABILNOSTI HBV NA RAZVOJ FULMINANTNOG HEPATITISA

Od samog otkrića HBV, primećeno je da izolati pokazuju prirodnu varijabilnost koja je posledica evolucije virusa. Prva podela bila je na serotipove koji su pokazivali jasnu geografsku distribuciju. Kasnije, sa razvojem molekularne biologije, uvedena je nova klasifikacija virusnih izolata na genotipove na osnovu razlike u nukleotidnoj sekvenci većoj od 8% duž celog genoma. Do danas je opisano 10 genotipova (A-J) koji pokazuju veoma jasnu geografsku distribuciju. Osim toga, dodatna klasifikacija na subgenotipove je uvedena kod nekoliko genotipova (A,B,C,D i F), a koja se zasniva na nukleotidnim razlikama većim od 4%. Pošto su slučajevi FH najčešće povezivani sa prisustvom BCP i Pre-C mutacija, očekivano je da genotipovi kod kojih je favorizovan nastanak ovih mutacija budu češće dovodeni u vezu sa FH. Poznato je da je prevalenca Pre-C mutacije 1896 povezana sa genotipovima koji imaju T nukleotid na poziciji 1858 (genotipovi B, D, E i poneki izolati genotipova C i F), a to se objašnjava strukturnim razlozima. Precore region genoma je neophodan za enkapsidaciju pregenomske RNK (signal za pakovanje, epsilon) i ima sekundarnu strukturu u obliku omče. Zato, mutacija nukleotida G u A na poziciji 1896, dovodi do stabilnog sparivanja sa nukleotidom na poziciji 1858 kod genotipova koji na tom mestu imaju T, ali ne i kod genotipova koji imaju C[8]. Tako autori iz Azije, izveštavaju o značajnijoj povezanosti genotipa B, posebno subgenotipa B1[12], sa fulminantnim hepatitisom u poređenju sa genotipom C, koji je takođe zastupljen u ovom delu sveta. Slično, u geografskim regionima sa

dominacijom genotipova A i D, stopa pojavljivanja FH je značajno viša za genotip D u odnosu na A[27].

ZAKLJUČAK

Razloge za nastanak fulminantnog hepatitisa i dalje treba tražiti u kompleksnom odnosu domaćina i virusa. Osobine virusnih izolata kod slučajeva FH pokazuju da faktori od strane samog virusa mogu igrati važnu ulogu. Poseban značaj pridaje se varijabilnosti virusa koja može da utiče na pojačanu repikativnu sposobnost virusnog soja i na toksičnu retenciju pojedinih virusnih strukturnih elemenata u inficiranim ćelijama, što za posledicu ima agresivan imunski odgovor domaćina.

LITERATURA

1. Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl* 2008;14 (Suppl 2):S67-S79.
2. Đokić M, Begović V, Rajić-Dimitrijević R, Aleksić R, Popović S, Hristović D. [Fulminant hepatitis B] *Vojnosanit Pregl* 2003;60:353-360.
3. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009;373:582—592.
4. Chen HL, Chang CJ, Kong MS, Huang FC, Lee HC, Lin CC, Liu CC, Lee IH, Wu TC, Wu SF, Ni YH, Hsu HY, Chen DS, Chang MH. Pediatric fulminant hepatic failure in endemic areas of hepatitis B infection: 15 years after universal hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004;39:58—63.
5. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009;49(5 Suppl):S13—S21.
6. Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *J Gen Virol* 2008;89:901—909.
7. Steinhauer DA, Holland JJ. Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA. *J Virol* 1986;57:219—228.
8. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007; 127: 164-176.
9. Kosaka Y, Takase K, Kojima M, Shimizu M, Inoue K, Yoshida M, Tanaka S, Akahane Y, Okamoto H, Tsuda F. Fulminant hepatitis B: induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* 1991;100:1087—1094.

10. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991;324:1705–1709.
11. Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, Tsuda F, Tanaka T, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 1995; 122: 241–249.
12. Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Okada S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006;44:326–34.
13. Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang JH, Sumino Y, Yatsushashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Case–control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. *Hepatol Res* 2009;39:648–656.
14. Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol* 1999;73:1239–1244.
15. Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, Schroder CH. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J Virol* 1993; 67: 3756–3762.
16. Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, Khan N, Trépo C, Wands J, Tong S. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol* 2003; 77: 6601–6612.
17. Chen M, Sallberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, Billaud JN, Milich DR. Immune tolerance split between hepatitis B virus pre-core and core proteins. *J Virol* 2005; 79:3016–3027.
18. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Nakayama N, Mochida S, Mizokami M. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. *Virology* 2007; 365: 285–291.
19. Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Wakui Y, Kondo Y, Fukushima K, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced intracellular retention of a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis. *Virology* 2009; 395:202–209.
20. Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced replication of

- hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients. *J Infect Dis* 2011;204:1017–1025.
21. Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J Hepatol* 2014;61:408-417
 22. Chen CH, Hung CH, Lee CM, Hu TH, Wang JH, Wang JC, Lu SN, Changchien CS. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology* 2007;133:1466–1474.
 23. Zhang D, Dong P, Zhang K, Deng L, Bach C, Chen W, Li F, Protzer U, Ding H, Zeng C. Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment. *BMC Microbiol* 2012;12:307.
 24. Pollicino T, Zanetti AR, Cacciola I, Petit MA, Smedile A, Campo S, Sagliocca L, Pasquali M, Tanzi E, Longo G, Raimondo G. Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1997;26:495–499.
 25. Ando BK, Moryama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang S, Chisari FV. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993;178:1541-1554.
 26. Kalinina T, Riu A, Fischer L, Will H, Sterneck M. A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutations from a patient with fulminant hepatitis. *Hepatology* 2001;34:385-394.
 27. Mojiri, A., Abbas, B.-B., Saberifirozi, M., Ardabili M, Beheshti M, Rahsaz M, Banihashemi M, Azarpira N, Geramizadeh B, Khadang B, Moaddeb A, Ghaedi M, Heidari T, Torab A, Salah A, Amirzadeh S, Jowkar Z, Mehrabani D, Amini-Bavil-Olyaei S, Dehyadegari MA. Hepatitis B virus genotypes in Southwest Iran: molecular, serological and clinical outcomes. *World J Gastroenterol* 2008; 14:1510–1513.

IMUNOPATOGENEZA WEST NILE VIRUSNE INFEKCIJE I RAZVOJ VAKCINE

Vesna Kovačević-Jovanović
Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak"

West Nile virus (WNV) je arbovirus koji pripada rodu Flavivirus, familiji Flaviviridae, serokompleks japanskog encefalitisa (1). Prvi put je opisan u Ugandi 1937. godine (2), a od tada su se javljale sporadične epidemije u Africi, Aziji, Evropi i Mediteranskom regionu.

Većina humanih infekcija WNV (~ 80%) prolazi bez simptoma; približno 20% inficiranih razvije nespecifične znake febrilne bolesti; manje od 1% zaraženih slučajeva razvije ozbiljne neuroinvazivne simptome, kao što su encefalitis, meningitis ili akutna flakcidna paraliza (3). Poslednjih nekoliko godina, WNV neuroinvazivna bolest je prijavljena u regionu Mediterana, centralnoj i jugoistočnoj Evropi: Italiji, Mađarskoj, Albaniji, Bivšoj Jugoslovenskoj Republici Makedoniji, Grčkoj, a 2012. godine bolest je prvi put opisana u Srbiji (4), sa 42 laboratorijski potvrđena slučaja (5).

Genom WNV čini jednolančana, pozitivna (+) RNK koja kodira tri strukturna proteina: kapsidni protein (C), glikoprotein ovojnice (E) i prekursorski membranski protein (prM), kao i sedam nestrukturnih proteina: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5. Među strukturnim proteinima virusa značajan je E glikoprotein- obezbeđuje apsorpciju, učestvuje u virusnoj hemaglutinaciji i značajan je za stvaranje neutrališućih antitela. Filogenetskim analizama do sada je opisano sedam genskih linija WNV.

Nakon uboda komarca WNV inficira keratinocyte i Langerhans ćelije, koje migriraju u regionalne limfne čvorove gde zapocinje proces replikacije. Virus se potom širi sistemski na unutrašnje organe, kao što su bubrezi i slezina, gde se odvija drugi krug replikacije, verovatno u epitelnim ćelijama i makrofagama. WNV se može vezati na Fc-receptore makrofaga, monocita i drugih ćelija. U zavisnosti od nivoa viremije virus može da prođe krvno-moždanu barijeru (BBB) i uzrokuje encefalitis. Ulasku virusa u CNS prethodi stimulacija Toll-like receptora i porast

TNF- α , što dovodi do povećane permeabilnosti hematoencefalne barijere (6).

IMUNSKI ODGOVOR

Pokazano je da su neutrofili najzastupljeniji tip imunskih ćelija koje se inicijalno i brzo regrutuju do mesta infekcije sa WNV. Makrofage mogu da kontrolišu infekciju kroz direktno preuzimanje virusa, pojačanje antigen prezentacije, sekreciju citokina i hemokina. IFN- α i IFN- β se proizvode tokom ranih faza WNV infekcije. g δ T ćelije direktno ograničavaju WNV infekciju (6). Pokazan je i značaj adaptivnog imuniteta -pasivan transfer monoklonskih ili poliklonskih antitela štiti miševе od letalne WNV infekcije (7). IgM je važan za ranu kontrolu infekcije i detektabilan je 4 do 7 dana posle infekcije. Generalno, ovi rezultati ukazuju da je za ograničenja viremije i širenje virusa u CNS neophodan neutrališući IgM odgovor, što rezultira u zaštiti od smrtonosne infekcije (7). Da li se kinetika IgM odgovora na WNV razlikuje između mladih i starih i kako to može uticati na podložnost teškom obliku infekcije ostaje da se utvrdi. Celularni imunski odgovor takođe kontroliše WNV infekciju. Citolitične T ćelije liziraju inficirane ćelije direktno kroz isporuku perforina i granzima A i B. CD8 + deficijentni miševi razvijaju perzistentnu infekciju mozga i pacijenti sa oštećenom T ćelijskom funkcijom imaju povećan rizik od neuroinvazivne infekcije (8).

Miševi sa genetskim ili stečenim deficijencijama CD4 + T limfocita imali su dugotrajnu WNV infekciju u CNS (9). Ovi rezultati sugerisu da je glavna zaštitna uloga CD4 + T ćelija tokom primarne infekcije WNV da pomogne u produkciji antitela i održi WNV-specifični CD8+ odgovor T ćelija u CNS.

Hemokin sistem je kritičan aspekt imunsog odgovora koji kontroliše migraciju leukocita u CNS. Značaj hemokina u kontroli WNV infekcija je ilustrovan činjenicom da hemokin CKSC motiv receptor 3 (CKSCR3) i CCTip hemokin receptor 5 (CCR5) knock-out miševi pokazuju povećanu smrtnost nakon infekcije (6).

Koliko se oštećenje ćelija može pripisati direktnom efektu virusa, a koliko inflamatornom odgovoru nije još uvek razjašnjeno. Za sada se ističe uloga TNF- α u modulaciji propustljivosti krvno-moždane barijere i

širenju WNV u CNS, gde dalje inficira neurone i eventualno glijalne ćelije.

Direktna infekcija neurona može dovesti do apoptoze putem kaspaze-3 i -9 (10). Osim toga, neuroni takođe odgovoraju na WNV infekciju pojačanom regulacijom pro-inflamatornih citokina kao što su IL-1 β , -6, -8 i TNF- α , što takođe doprinosi daljem oštećenju neurona (11). Infekcija glijalnih ćelija dovodi do pojačane ekspresije CKSCL10, IL-1 β i različitih adhezivnih molekula, što dalje dovodi do povećane propustljivosti krvno-moždane barijere (6). U kojoj meri ova inflamacija doprinosi patologiji bolesti ostaje nejasno. Konkretno, doprinos neurona zapaljenju je predmet intenzivnih istraživanja.

Najveći deo naučnih saznanja o imunskom odgovoru i patogenezi WNV infekcije je izveden iz studija na miševima. Koliko se imunski odgovor razlikuju kod sisara i kako on utiče na tok bolesti nije u potpunosti jasno. Uloga imunsog sistema u patogenezi WNV ostaje spekulativna. Razlozi zašto se neuroinvazivni oblik bolesti javlja u manje od 1% inficiranih ostaju neobjašnjivi. Međutim, verovatno da nakon infekcije WNV ulazi u CNS značajno većeg broja pacijenata, ali da određeni faktori domaćina, kao što je hiperaktivni zapaljenski odgovor, dovode do prekomerne propustljivosti krvno-moždane barijere, kao i preterane neuronske smrti, čime se na kraju menjaju zaštitni efekti imunskog sistema.

RAZVOJ VAKCINE

Trenutno tri WNV vakcine poseduju dozvolu za upotrebu na životinjama. Prve dve sadrže inaktiviran WN virus. Treća komercijalizovana WNV vakcina je himerni rekombinantni canaripokvirus vakcina. Ova vakcina sadrži gene prM i E izvedene iz izolata Njujork 1999 (12).

WNV vakcine u pripremi

Rekombinantni virus gripa koji sadrži domen III E proteina WN virusa je ocenjen kao vakcina kandidat u mišjem modelu (13). Domen III E protein WNV je kloniran u N-terminalnom regionu neuraminidaze virusa gripa, čime je uništena funkcionalna aktivnost virusa gripa. Potkožna imunizacija miševa sa vakcinom rezultira visokim nivoom neutrališućih IgG antitela.

Sledeći kandidat je adenovirusna vakcina koja sadrži četiri WNV proteina- C, preM, E i NS1 eksprimirana u adenovirusu kao vektoru. Iako ovi proteini potiču iz filogenetske linije II virusa, uzorci seruma uzimani posle vakcinacije miševa sadržavali su antitela koja neutrališu linije I i II virusa (14).

Još jedna strategija koja je procenjena kao uspešna je vakcinacija sa prečišćenim virusnim proteinima. Za sada je više injekcija i / ili jaki adjuvansi potrebno da se dostigne prihvatljiv nivo efikasnosti (12). Konačno, četvrta strategija koristi DNK vakcinu kao platformu za WNV vakcinaciju. Plazmid DNK koji kodira WNV membranski (M) i protein ovojnice (E), ubrizgan intramuskularno kod miševa i konja obezbeđuje zaštitu od WNV (15). DNK vakcinacija rezultira kako u humoralnom, tako i u jakom Th1 odgovoru (15).

Klinička ispitivanja WNV vakcine kod ljudi

Trenutno, ne postoje odobrene vakcine za ljudsku upotrebu, ali nekoliko kliničkih ispitivanja su u toku. 2005. je uspešno završena I faza kliničkih ispitivanja sa vakcinom Chimeri- Vak-WN. ChimeriVak-Zapadni Nil (Acambis, Sanofi Pasteur-) koristi atenuirani soj virusa žute groznice (17d) da izgradi živi himerični virus koji se sastoji od prM i E proteina WNV u kontekstu kapsida virusa žute groznice i ne-strukturnih proteina (16). ChimeriVak-Zapadni Nil je najnaprednija vakcina u razvoju. U prvom delu faze II, u zdravih odraslih osoba 18-40 godina, jedna doza ChimeriVak-WN je dovela do razvoja neutrališućih antitela 28 dana posle vakcinacije (16). Drugi deo faze II pokazao je bezbednost i toleranciju kod zdravih osoba preko 41 godine starosti. Serokonverzija je postignuta 28. dana od više od 96% zdravih odraslih osoba.

Još jedna himerna vakcina (VN-DEN4) koja koristi oslabljeni Dengue virus za PRM-E gene WNV (17) se nalazi u fazi II kliničkih ispitivanja.

Uporedo se radi na razvoju DNK plazmid vakcine. 2005. godine pokrenuta je, i uspešno završena I faza kliničkog ispitivanja. Nakon toga, proizvedena je druga generacija DNK vakcina koja koristi poboljšani vektor, i koja je ispitivana u fazi I. Vakcina se dobro toleriše bez ozbiljnih neželjenih efekata. Svi ispitanici posle 3 doza vakcine razvijaju neutrališuća antitela (18). Većina ispitanika razvija CD4 + odgovor

umesto CD8 + odgovora, koji je najvećim delom usmeren na WNV E protein.

Virus zapadnog Nila ostaje ozbiljna pretnja za javno zdravlje, posebno za decu, starije osobe i imunokompromitovane pacijente. Dijagnostički testovi su znatno poboljšani i omogućavaju brzu detekciju prisustva WNV. Razvoj vakcina protiv WNV pokazuje napredak-nekoliko kliničkih ispitivanja u različitim fazama su u toku, ali biće potrebno izvesno vreme pre nego vakcina postane dostupna. S obzirom na blage kliničke znake kod većine obolelih, vakcinacija će verovatno ciljati grupe sa višim rizikom za neuroinvazivnu bolest.

REFERENCE:

1. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989;70:37–43.
2. Smithburn KCH, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1940, 20, 471–472.
3. Brandler S and Tangy F. Vaccines in Development against West Nile Virus. *Viruses* 2013, 5, 2384-2409.
4. Popović N, Milošević B, Urošević A, Poluga J, Lavadinović L, Nedeljković J, Jevtović D, Dulović O. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(43):pii=20613.
5. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut” Izveštaj o zaraznim bolestima koje mogu predstavljati potencijalnu pretnju po javno zdravlje (<http://www.batut.org.rs/download/izvestaji/izvestajOPotencijalnimPretnjamaZarazneBolesti2012Latinica.pdf>).
6. Lim SM, Koraka P, Osterhaus A and Byron M. West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis *Viruses* 2011, 3, 811-828.
7. Diamond M., Sitati EM, Friend LD, Higgs S, Shrestha B, Engle M. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* 2003, 198, 1853–1862.
8. Shrestha B, Diamond MS. Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *J. Virol.* 2004, 78, 8312–8321.

9. Sitati EM, Diamond MS. CD4+ T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system. *J. Virol.* 2006, 80, 12060–12069.
10. Samuel MA, Morrey JD, Diamond MS. Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* 2007, 81, 2614–2623.
11. Kumar M, Verma S, Nerurkar VR. Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *J. Neuroinflammation* 2010, 7, 73.
12. Filette MD, Ulbert S, Diamond MS and Sanders NN. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary Research* 2012, 43:16.
13. Yamshchikov G, Borisevich V, Seregin A, Chaporgina E, Mishina M, Mishin V, Kwok CW, Yamshchikov V. An attenuated West Nile prototype virus is highly immunogenic and protects against the deadly NY99 strain: a candidate for live WN vaccine development. *Virology* 2004, 330:304-312.
14. Demento SL, Bonafe N, Cui W, Kaech SM, Caplan MJ, Fikrig E, Ledizet M, Fahmy TM: TLR9-targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis. *J Immunol* 2010, 185:2989-2997.
15. Dunn MD, Rossi SL, Carter DM, Vogt MR, Mehlhop E, Diamond MS, Ross TM. Enhancement of anti-DIII antibodies by the C3d derivative P28 results in lower viral titers and augments protection in mice. *Virol J* 2010, 7:95.
16. Biedenbender R, Bevilacqua J, Gregg AM, Watson M, Dayan G: Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults. *J Infect Dis* 2011, 203:75-84.
17. Pletnev AG, Swayne DE, Speicher J, Rumyantsev AA, Murphy BR. Chimeric West Nile/dengue virus vaccine candidate: preclinical evaluation in mice, geese and monkeys for safety and immunogenicity. *Vaccine* 2006, 24:6392-6404.
18. Ledgerwood JE, Pierson TC, Hubka SA, Desai N, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Nelson S, Nason M, Gu W, Bundrant N, Koup RA, Bailer RT, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS. A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J Infect Dis* 2011, 203:1396-1404.

REZULTATI PRAĆENJA REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE U SRBIJI – LOKALNA AKCIJA I UČEŠĆE U GLOBALNIM AKTIVNOSTIMA

Zora Jelesić, Mira Mihajlović-Ukropina
Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, Srbija

Rezistencija bakterija na antimikrobne lekove je globalni problem, vrlo izražen i u Srbiji. Cilj izlaganja je da se prikažu rezultati funkcionisanja sistema praćenja rezistencije u našoj zemlji, učešće u međunarodnim aktivnostima vezanim za antimikrobnu rezistenciju i podaci o rezistenciji invazivnih izolata u Srbiji za 2014. godinu.

Na osnovu podataka o 1590 bakterija izlovanih iz krvi i likvora, prikupljenih iz 14 kliničkih laboratorija Nacionalne mreže za praćenje rezistencije i analiziranih u Referentnoj laboratoriji za registrovanje i praćenja rezistencije bakterijskih sojeva na antimikrobna sredstva Instituta za javno zdravlje Vojvodine utvrđeno je da postoji visok nivo rezistencije kod svih vrsta čija se osetljivost prati. Vrlo visok nivo rezistencije na cefalosporine III generacije zabeležen je kod *Klebsiella pneumoniae* (88,5%) i *Escherichia coli* (37,5%). Zabrinjava nalaz rezistencije na karbapeneme kod *Klebsiella pneumoniae* (31,4%) i *Escherichia coli* (0,9%), kao i pojava rezistencije na kolistin kod 13% multirezistentnih klebsijela. Dokazana je multipla rezistencija kod *Pseudomonas aeruginosa* i zabrinjavajuće proporcije otpornosti *Acinetobacter spp* od preko 90% za većinu testiranih grupa antibiotika. Visok procenat rezistentnih izolata *Enterococcus faecalis* na aminopenicilin, *Enterococcus faecium* na vankomicin i rezistencija na linezolid, verovatno ukazuju na probleme u identifikaciji ovih bakterija do nivoa vrste. Rezistencija na meticilin kod *Staphylococcus aureus* prisutna je u 34% izolata.

Učešće 14 laboratorija iz mreže za praćenje rezistencije u eksternoj proveru kvaliteta rada od strane UKNEQAS, London (kontrola organizovana u okviru učešća u CAESAR-u – *Central Asian and Eastern European Antimicrobial Surveillance Network*) pokazalo je visok procenat saglasnosti rezultata sa standardom, odnosno tačnim rezultatom za većinu od 6 testiranih uzoraka. Problem je uočen kod tumačenja rezultata

osetljivosti na amikacin i piperacilin-tazobaktam kod enterobakterija, u detekciji beta-laktamaza proširenog spektra, kao i zabrinjavajući neuspeh u detekciji smanjene osetljivosti *Staphylococcus aureus* na vakomicin, što je bio slučaj kod svih 134 laboratorija koje su učestvovala u proveru kvaliteta rada.

Po prvi put ove godine rezultati osetljivosti invazivnih izolata iz Srbije, vidljivi su u izveštajima izvan naše zemlje: globalni izveštaj SZO o praćenju rezistencije na antimikrobne lekove, prvi CAESAR izveštaj biće objavljen krajem aprila 2015. godine, u kome je Srbija jedna od prvih pet država čiji će podaci biti prezentovani. Uspešno učešće u EUSCAPE projektu rezultiralo je prikupljanjem karbapenemaza-produkujućih enterobakterija iz Srbije, koje će kao deo evropske kolekcije sojeva, biti podvrgnute molekularnom testiranju u cilju dokazivanja klonalnog porekla i epidemiologije rezistencije u Evropi.

S obzirom da postoje objektivni podaci o visokom nivou rezistencije u Srbiji, potrebna je hitna akcija na sprečavanju njenog nastanka i širenja u kojoj bi učestvovali multidisciplinarni timovi. Neophodno je formiranje multidisciplinarnog tela za kontrolu rezistencije, koje bi radilo na donošenju nacionalne strategije i akcionog plana za borbu protiv rezistencije. Nastavak sistematskog prikupljanja podataka o rezistenciji bakterija na antimikrobne lekove u okviru CAESAR mreže i dalji rad na unapređenju dijagnostike i osposobljenosti laboratorija za detekciju mehanizama rezistencije, kao i bolja saradnja sa referentnim laboratorijama su od značaja. Potrebno je takođe povećanje svesti stručnjaka o prisustvu i značaju rezistencije bakterija u Srbiji, poboljšanje rada na sprečavanju širenja rezistencije (epidemiološke i higijenske mere) i unapređenje saradnje multidisciplinarnih timova u bolnicama na sprečavanju razvoja i širenja rezistencije.

Ključne reči: rezistencija, antibiotici, bakterije

PREVALENCIJA ANTIMIKROBNE REZISTENCIJE KOD HUMANIH NETIFOIDNIH IZOLATA *SALMONELLA ENTERICA* U SRBIJI

Nataša Galić-Živanić, Ljiljana Pavlović, Edita Grego
Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", Beograd, Republika Srbija

Netifoidni serotipovi *Salmonella enterica* (NTS) su posle *Campylobacter* vrsta drugi vodeći uzročnik zoonoza i bolesti koje se prenose kontaminiranom hranom i vodom u zemljama Evropske unije. Prema Godišnjim izveštajima o kretanju zaraznih bolesti u Republici Srbiji tokom poslednje decenije salmoneloza je vodeća bakterijska crevna infekcija sa opadajućim trendom oboljevanja. Zahvaljujući nedovoljno ograničenoj i nedovoljno kontrolisanoj profilaktičkoj upotrebi antibiotika u subterapijskim dozama kao faktora rasta životinja za ljudsku ishranu, ekstenzivnoj upotrebi u veterinarskoj i humanoj medicini, globalnoj trgovini hrane, pojava (multiple) rezistencije na antimikrobne agense NTS postala je globalni javno-zdravstveni problem, a naročito u zemljama u razvoju. Antibiotička terapija salmoneloze blage i umereno teške kliničke slike se ne preporučuje za razliku od ozbiljnih ekstraintestinalnih komplikacija i invazivnih infekcija, odnosno rizičnih grupa pacijenata. Sve rasprostranjenija i učestalija pojava rezistencije na antimikrobne agense najčešćih NTS, a naročito pojava smanjene osetljivosti ili rezistencije na fluorokvinolone (FQ) i cefalosporine širokog spektra, veoma je suzila izbor lekova za efikasnu antibiotsku terapiju i dovela do problema neuspešnog lečenja teških oblika salmoneloze. Značaj navedenih antibiotika ogleda se i u činjenici da se nalaze u grupi kritički važnih antibiotika za humanu medicinu na listi Svetske zdravstvene organizacije (SZO). Salmoneloza je oboljenje koje prema Zakonu o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti u Srbiji podleže obaveznom prijavljivanju, ali ne prema definiciji slučaja o zaraznim bolestima, tako da je laboratorijski zasnovan epidemiološki nadzor salmoneloze u Srbiji insuficijentan, odnosno karakteriše ga podregistracija slučajeva oboljevanja i nepostojanje uređenog sistema praćenja pojave antimikrobne rezistencije NTS.

Predavanje će pružiti uvid o najraširenijim i pretećim rezistentnim fenotipovima (emerging phenotypes) otkrivenim kod najčešćih serotipova

NTS humanog porekla izolovanih u periodu od 2004-2013. godine u mikrobiološkim laboratorijama Srbiji, a tipiziranih u Referentnoj laboratoriji za *Salmonella* (RLS) u Institutu za javno zdravlje Srbije. Od 2003. godine RLS traži od mreže mikrobioloških laboratorija slanje svih primoizolata *Salmonella* spp. (osim *S. Enteritidis*) u RLS na konačnu ili potvrdnu identifikaciju serotipa. Svaki primljeni izolat se testira i u cilju praćenja osetljivosti i otkrivanje rezistencije na antimikrobne agense (AMR). Druga pravila važe za slanje izolata epidemijskog porekla i primoizolata *S. Enteritidis* kao apsolutno dominantnog serotipa u Srbiji (10% od godišnjeg broja izolovanih u mikrobiološkim laboratorijama).

U RLS su izolati NTS biohemijski identifikovani konvencionalnim metodama i serotipizirani metodom aglutinacije prema Kauffmann-White shemi. Osetljivost na antibiotike je testirana metodom disk difuzije i interpretirana (S/I/R) prema CLSI standardu na 12 antimikrobnih agenasa od kliničkog i epidemiološkog značaja (ampicilin A₁₀, hloramfenikol C₃₀, tetraciklin T₃₀, trimetoprim Tmp₅, sulfonamid Su₃₀₀, streptomycin S₁₀, gentamicin Gn₁₀, nalidiksinska kiselina Na₃₀, ciprofloksacin Cip₅ i Cip₁, cefotaksim Ctx₃₀, ceftazidim Caz₃₀, meropenem Mem₁₀) izabrana prema programu WHO/GFN. Etest metod je korišćen za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za Cip kod Na-R izolata u cilju otkrivanja smanjene osetljivosti na FQ, pri čemu je rezistencija interpretirana prema EUCAST/ECOFF vrednosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/epidemiological cut off of CIP MIC>0.064 mg/L). U svrhu monitoringa potvrda fenotipa ESBL-pozitivnih izolata je testirana duplim disk difuzionim testom-test sinergizma za cefotaksim i ceftazidim, a otkrivanje prisustva pAmpC fenotipa disk difuzionim testom na cefoksitin. Za internu kontrolu kvaliteta korišćene su referentne kulture *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, a eksterna kontrola kvaliteta serotipizacije i testiranja osetljivosti na antibiotike je sprovedena od strane WHO/GFN.

Rezistentni izolati *S. Typhimurium* i *S. Hadar* su analizirani reakcijom lančane polimerizacije (PCR) sa specifičnim prajmerima u cilju otkrivanja genskih determinanti 162-bp segmenta za *S. Typhimurium* DT104 fagotip, kao i integrona klase 1 i 2. Izvršen je skrining na prisustvo gena odgovornih za antimikrobnu rezistenciju na ampicilin, hloramfenikol, aminoglikozide, trimetoprim, sulfonamide, tetracikline. NTS sa fenotipom

ESBL/pAmpC su testirani u cilju otkrivanja familija gena *bla*_{CTX-M-1/2/8/9/25}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} odnosno *bla*_{CMY-2}.

Tokom predavanja biće predstavljeni najvažniji podaci o pojavi AMR epidemiološki nepovezanih rezistentnih izolata (4416) *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar* i *S. Kentucky* poreklom iz fecesa (97%), krvi i urina (3%). U analiziranom periodu u Srbiji serotipovi *S. Enteritidis* i *S. Hadar* su ispoljili opadajući trend učestalosti pojave AMR, a rastući pojava multirezistentnih *S. Typhimurium* i *S. Infantis*. Kod *S. Enteritidis*, najčešćeg i najvažnijeg serotipa u Srbiji, registrovana je niska učestalost AMR - 7% sa opadajućim trendom (211/2955). Fenotip Na-R/Cip-LLR tj. smanjena osetljivosti na Cip bez kliničke rezistencije je otkriven kod 5% izolata, što Srbiju svrstava među zemlje u Evropi sa niskom učestalošću rezistencije na FQ. U istraživanju Kozoderović i saradnika ispitivanjem mehanizama rezistencije izolata *S. Enteritidis* Na-R iz Južnobačkog okruga otkriveno je postojanje polimorfizma mutacija u *gyrA* genu na pozicijama 83. i 87. sekveniciranjem QRDR regiona. *S. Enteritidis* je u velikom delu sveta najčešći uzročnik salmoneloze, što je vrlo značajno, jer je istorijski ovaj serotip karakterisala osetljivost na antibiotike, za razliku od serotipova *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Virchow* i *S. Infantis*. Testiranjem izolata *S. Typhimurium*, drugog po učestalosti serotipa u Srbiji, registrovana je značajna pojava rezistencije, naročito multirezistencije. Otkriveno je 30% (260/879) rezistentnih izolata sa izrazitom heterogenošću fenotipova i visokom učestalošću multirezistentnih izolata (MDR \geq 3AB), 83% (216/260). Najčešći, pandemijski pentarezistentni fenotip karakterističan za *S. Typhimurium* ACSSuT-R bez ili sa korezistencijom na Na/Tmp, registrovan je kod 36% (93/260) rezistentih izolata *S. Typhimurium* DT104 fagotipa i *S. Typhimurium* non-DT104. PCR metodom otkriveno je da MDR izolate *S. Typhimurium* u Srbiji karakteriše dominantno prisustvo gena za integrone klase 1 od 1 kbp i 1.2 kbp, *sul1*, *blaPSE*, *flo*, *aadA1*, *tetG*, *dfrA15*. Od 2009. godine u Srbiji je uočena češća pojava serotipa *S. Infantis*, sa pozitivnim trendom pojave rezistencije serotip-specifičnog fenotipa TNa-R/Cip-LLR i učestalošću od 36% (141/389), bez pojave kliničke rezistencije na FQ. Ispitivanjem mehanizama kvinolonske rezistencije sekvenciranjem *gyrA* i *parC* izolata *S. Infantis* humanog i živinskog porekla u istraživanju Velhner i saradnika, otkrivena je kod svih izolata mutacija u *gyrA* QRDR regiona (Ser83→Tyr), uticaj efleks pumpe, ali i mutacija *parC* (Ser80→Arg) za izolate sa MIC_{Cip}=2 mg/L. Determinišući

geni plazmidskog porekla nisu otkriveni. PFGE analizom dokazano je da u Srbiji izolati *S. Infantis* imaju sličan ili identičan profil što ukazuje na klonalno širenje. Praćenje mehanizama rezistencije kod *S. Infantis* je vrlo važno zbog globalne distribucije rezistentnih klonova ovog sve češćeg serotipa, najčešće živinskog porekla. Takođe, važan serotip u Srbiji zbog značajno česte pojave rezistencije je *S. Hadar*, koji je do 2007. godine spadao u pet najčešćih serotipova *S. enterica* humanog porekla u Srbiji. Registrovano je 82% rezistentnih fenotipova *S. Hadar* (119/145), pri čemu su dominirali fenotipovi ASTNa/ATNa/STNa-R sa Cip-LLR (84%). Najzastupljeniji geni odgovorni za rezistenciju izolata *S. Hadar* u Srbiji su bili sa *bla*TEM, *strA* i *tetA*. Za razliku od navedenih i drugih serotipova NTS identifikovanih u RLS, jedino je kod izolata *S. Kentucky* uočena pojava fenotipa sa kliničkom rezistencijom na ciprofloksacin i to od obolelih koji su dali podatak da su boravili u Egiptu i Tunisu. Osim pojave smanjene osetljivosti NTS na FQ kao kritično važne antibiotike, u Srbiji je od 2009. godine registrovana pojava serotipova NTS koji produkuju enzime odgovorne za rezistenciju na cefalosporine III generacije. Njihova učestalost prema podacima RLS je vrlo niska, ali se najčešće javljaju kod serotipova dominantno živinskog porekla (*S. Enteritidis* i *S. Infantis*) i to beta-laktamaze proširenog spektra iz klastera CTX-M-1 i CTX-M-2. U ispitivanom periodu u RLS pojava rezistencije na karbapeneme nije registrovana.

Nekritična upotreba antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini, proizvodnji životinja za ishranu ljudi i poljoprivrednih kultura promoviše razvoj i širenje antimikrobne rezistencije mikroorganizama koja ne poznaje geografske ili biološke granice. Posledično, upotreba antibiotika u jednoj niši, sektoru ili teritoriji utiče na širenje rezistencije u drugoj. Jedan od najboljih primera je pojava antimikrobne rezistencije kod *Salmonella* koja je dokazano povezana sa upotrebom antibiotika u proizvodnji hrane za ljude. Takođe, poznato je da se infekcije izazvane rezistentnim uzročnicima duže i teže leče, sa produženom hospitalizacijom, većim rizikom od ekstraintestinalne invazije uzročnika, nepovoljnim ishodom i visokim troškovima lečenja. U funkciji javnog zdravlja stanovništva u Srbiji je od izuzetne važnosti uspostavljanje multisektorskog praćenja i nadzor nad pojavom antimikrobne rezistencije kod uzročnika bolesti koje se prenose hranom i vodom, u humanoj i veterinarskoj medicini i poljoprivredi.

TRENDOWI REZISTENCIJE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* I *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* NA ANTIBIOTIKE U SRBIJI

¹Nataša Opavski, ¹Vera Mijač, ¹Ina Gajić, ²Edita Grego, ¹Dušan Kekić, ¹Boris Jegorović,
¹Lazar Ranin

¹Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Beograd

¹Referentna laboratorija za streptokok

²Institut za javno zdravlje Srbije „Milan Jovanović Batut“, Beograd

Lekovi prvog izbora za lečenje bakterijskih respiratornih infekcija su beta laktamski antibiotici i makrolidi. Kao posledica njihove neracionalne upotrebe je, tokom poslednjih decenija, došlo do porasta rezistencije na ove lekove kod najčešćih bakterijskih respiratornih patogena - *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus pneumoniae*. U vanbolničkoj sredini, izolati penicilin neosetljivog *S.pneumoniae* (PNSP), makrolid rezistentnog *S.pneumoniae* (MRSP), kao i makrolid rezistentne grupe A streptokoka (MRGAS) predstavljaju markere rezistencije na ove antibiotike. Incidencija rezistentnih izolata streptokoka varira između zemalja i kreće se u rasponu od <5% u zemljama severne Evrope, do 20-40% u zemljama Mediterana. U cilju prevencije daljeg porasta neosetljivosti na antibiotike, u pojedinim zemljama su uvedene mere sveobuhvatnog praćenja rezistencije, izmenjeni su protokoli za lečenje respiratornih infekcija i ograničena upotreba antibiotika, što je imalo pozitivan efekat, te je zabeležen pad incidencije rezistentnih izolata streptokoka.

Analiza osetljivosti invazivnih i neinvazivnih izolata streptokoka u Srbiji od 2008. godine, naovamo je pokazala da je ukupna rezistencija *S.pneumoniae* na makrolide bila 34%. MRSP je češće nađen kod dece i među neinvazivnim izolatima, nego kod odraslih pacijenata i invazivnih sojeva. Među MRSP je dominirao visoko rezistentni MLS fenotip - skoro 80% sojeva je bilo ukršteno rezistentno na makrolide i linkozamide. S obzirom na zahtevne i komplikovane kriterijume za procenu rezistencije pneumokoka na beta laktamske antibiotike (BLA), koji su se i menjali tokom poslednjih godina, nije utvrđeno koliki je procenat sojeva *S.pneumoniae* neosetljiv na BLA, ali je ustanovljeno da je 16% MRSP pokazivalo istovremenu rezistenciju i na BLA. Nasuprot rezistenciji na makrolide, PNSP je češće nađen kod invazivnih u odnosu na neinvazivne izolate. Međutim, to nije bila posledica stvarne razlike u stepenu

osetljivosti između ove dve grupe sojeva, već drugačijih, oštrijih kriterijuma za procenu osetljivosti izolata iz likvora, na penicilin. Vrednosti MIK_{50} , odnosno MIK_{90} penicilina su u obe grupe sojeva bile slične. Među našim MRSP smo našli vrlo visok nivo rezistencije na tetracikline i trimetoprim-sulfametoksazol (>70%), dok je osetljivost na levofloksacin, telitromicin, cefotaksim i imipenem bila visoka (preko 90%). Nisu nađeni sojevi pneumokoka rezistentni na vankomicin, linezolid, moksifloksacin, sparfloksacin i rifampicin.

Analiza osetljivosti grupe A streptokoka na makrolide u Srbiji je pokazala da se u petogodišnjem periodu (od 2008. do 2013. godine) nivo rezistencije GAS na ove antibiotike održavao na umerenom nivou - 11% do 12%. Uočena je, međutim, izmena u distribuciji fenotipova rezistencije. Dok je u prvom periodu (2008-2010.) ubedljivo dominirao niskorezistentni M fenotip (75%), dotle je u 2013. došlo do značajne izmene, te je blizu 90% izolata pripadalo visokorezistentnom MLS fenotipu, a svega 11% sojeva je ekspimiralo M fenotip. Metodama molekularne tipizacije - *emm* tipizacija i PFGE (*engl.* Pulsed-Field Gel Electrophoresis) smo pokazali da sojevi MRGAS većinom pripadaju *emm* tipovima 12, 75 i 77 i da su klonski distribuirani u Srbiji. Među MRGAS sa M fenotipom smo našli 8 različitih pulso-tipova, od kojih su dva bila dominantna, dok je kod MLS fenotipa nađeno samo 3 PFGE profila. Sojevi *S.pyogenes* su i dalje u visokom procentu osetljivi na hloramfenikol i u potpunosti na penicilin.

Navedeni rezultati ispitivanja osetljivosti streptokoka u našoj referentnoj laboratoriji za protekli petogodišnji period pokazuju da je rezistencija izolata pneumokoka i grupe A streptokoka na makrolide u Srbiji, umerena do visoka, kao i da dolazi do promena u trendovima rezistencije streptokoka na makrolide, u smislu izmena dominantnih fenotipova i genotipova.

ANAEROBNE BAKTERIJE U ETIOLOGIJI HUMANIH INFEKCIJA

Marina Dinić, Branislava Kocić
Nacionalna referentna laboratorija za anaerobne infekcije
Institut za javno zdravlje Niš
Medicinski fakultet Niš

Podaci o infekcijama izazvanim anaerobnim bakterijama datiraju još iz vremena pre nove ere Hipokratovim opisom tetnusa. Međutim, tek u XVII veku Antonie van Leeuwenhoek u jednom od eksperimenata otkriva bakterije u sredini bez prisustva kiseonika. Dva veka kasnije, kada je Louis Pasteur izolovao *Clostridium butyricum* u atmosferi bez kiseonika i definisao anaerobiozu, počinju istraživanja uloge anaerobnih bakterija u etiologiji infekcija kod ljudi.

Krajem devetnaestog veka francuski istraživači objavljuju podatke o anaerobima kao etiološkim agensima pelvičnih infekcija, abscesa mozga, gangrene apendicitisa. U isto vreme bivaju definisana oboljenja nastala delovanjem klostridijalnih toksina, tetanus i botulizam. *Clostridium tetani* je izolovan u čistoj kulturi 1890. godine, kada počinju istraživanja koja će omogućiti imunizaciju.

Prvi podaci o endogenim infekcijama anaerobnim bakterijama datiraju sa početka XX veka kada je Hugo Schottmuller (1867-1936) opisao anaerobne koke kao uzročnike puerperalne sepse. Nekoliko godina kasnije, ovaj istraživač opisuje orofaringealnu infekciju anaerobnim bakterijama komplikovanu septikemijom tzv. «postaginoznu sepsu». Detaljan opis ovog oboljenja izrokovanog vrstom *Bacillus funduliformis* (sada *Fusobacterium necrophorum*) 1936 godine prikazao je Andre Lemierre. Orofaringealna infekcija sa trombozom jugularne vene i septikemijom je po ovom istraživaču dobila naziv Lemierre-ov sindrom.

Razvojem metoda za uspešno izolovanje anaerobnih bakterija utvđena je njihova uloga u etiologiji infekcija i potvrđena je efikasnost terapije antibioticima. Većina vrsta anaerobnih bakterija, sa izuzetkom klostridija, je niskog patogenog potencijala, infekcije su često polimikrobne prirode i razvijaju se kod bolesnika sa hroničnim ili teškim oboljenjima. S obzirom na to da je napredak u oblasti humane medicine omogućio je efikasnije lečenje hroničnih bolesnika, poslednjih decenija povećan je broj imunokompromitovanih osoba a uporedo sa tim i učestalost infekcija anaerobnim bakterijama.

Osnovna karakteristika anaerobnih bakterija da rastu u odsustvu kiseonika. Ove bakterije generišu energiju fermentacijom i krajnji akceptori elektrona su organska jedinjenja. Iz tog razloga ne mogu dugo opstati u prisustvu atmosferskog kiseonika. Postoje razlike u osetljivosti na kiseonik na osnovu čega su anaerobne bakterije podeljene u dve osnovne grupe na aerotolerantne i obligatne anaerobe.

Aerotolerantni anaerobi imaju sposobnost rasta u prisustvu atmosferskog kiseonika ali ne generišu energiju respiracijom i optimalno rastu u sredini bez kiseonika (*Clostridium tertium*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium carnis*). Karakteristika ovih bakterija je da rastu i u prisustvu 5-10% kiseonika ali kultivisanjem u anaerobnim uslovima stvaraju veće kolonije.

Obligatni anaerobi se razlikuju po osetljivosti na kiseonik. Tako umereni obligatni anaerobi poseduju osobinu da tolerišu izlaganje atmosferskom kiseoniku i nekoliko sati, ne rastu u atmosferi sa više od 2-8% kiseonika. Za razmnožavanje su neophodni anaerobni uslovi. Striktni obligatni anaerobi ne rastu u atmosferi sa >0,5% kiseonika, izlaganje atmosferskom kiseoniku ubija ih za samo nekoliko minuta. Većina anaerobnih bakterija koje izazivaju infekcije kod ljudi spada u umerene obligatne anaerobe.

Kiseonik je toksičan za striktne obligatne anaerobe. Parcijalna redukcija kiseonika rezultuje stvaranjem toksičnih produkata - vodonik peroksida ili superoksidnih radikala koji reagujući sa proteinima, lipidima ćelijske membrane dovode do smrti ćelije. Dugo je kao objašnjenje osetljivosti anaeroba na kiseonik i njihove nemogućnosti preživljavanja u prisustvu atmosferskog kiseonika, bila tvrdnja da ne poseduju efikasne mehanizme odbrane od toksičnih derivata kiseonika. Mnogi obligatni anaerobi nalaze se u aerisanoj sredini, kao što je usna duplja, gde se nalaze u mešovitom habitatu sa fakulativnim anaerobima i aerobima. Postoji više faktora koji anaerobima omogućavaju aerotoleranciju: određena količina antioksidativnih odbrambenih enzima (katalaza i superoksid dizmutaza), prisustvo ćelijskih komponenti koje nisu osetljive na toksične efekte kiseonika, negativna aerotaksija, ekspresija transmembranskih hemoreceptora. Ovi odbrambeni sistemi omogućavaju opstanak anaeroba u uslovima tranzientne aerobioze.

Poslednjih nekoliko decenija brojnim istraživanjima dokazano je da anaerobne bakterije mogu posedovati katalazu i superoksid dizmutazu (SOD). Pretpostavlja se da je sinteza ovih enzima za antioksidativnu zaštitu indukovana kiseonikom ili produktima njegove nekompletne redukcije. Nivo aktivnosti ovih enzima kod pojedinih sojeva korelira sa njihovom aerotolerancijom.

Mnoge vrste roda *Bacteroides* (*B.fragilis*, *B.distasonis*, *B.tetaiotaomicron*, *B.ovatus*) su katalaza pozitivne. *B.fragilis*, najčešći uzročnik infekcija kod ljudi, može opstati pod dejstvom kiseonika i do sedam dana. Slaba osetljivost vrste *B.fragilis* na kiseonik je faktor virulencije kojim se bakterijske ćelije štite od derivata kiseonika nastalih tokom metabolizma ćelija domaćina ili produkovanih od strane fagocita. Katalaza je detektovana i kod nekih vrsta roda *Porphoryromonas* (*P.gingivalis*, *P.salivosa*).

Superoksid dizmutaza predstavlja značajan faktor virulencije omogućavajući opstanak patogenih anaeroba u tkivima tokom inicijalne faze infekcije pre nego što se stvore anaerobni uslovi neophodni za rast i razmnožavanje. Među prvim obligatnim anaerobima kod koji je dokazana produkcija SOD nalaze se neke vrste roda *Clostridium* (*C. butyricum*, *C.perfringens*). Mnoge vrste roda *Bacteroides* (*B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. fragilis*) i *Porphoryromonas gingivalis* proizvode SOD. *C.perfringens* ima sposobnost rasta u uslovima aerobioze, preživljava unutar makrofaga, što je značajan faktor virulencije u ranoj fazi infekcije rana uzrokovane ovom bakterijom. *C.perfringens* poseduje kompleksan sistem gena koji mu omogućavaju antioksidativnu adaptaciju a kodiraju sintezu enzima kao što su SOD, alkilhidroperoksid reduktazu, superoksid reduktazu. Može preživeti 1 sat pri koncentraciji kiseonika od 20%.

C.tetani pored SOD, poseduje peroksidazu što omogućava ovom patogenu kratkotrajno preživljavanje u prisustvu kiseonika u procesu infekcije rana, što je takođe važan faktor virulencije.

Osetljivost anaerobnih bakterija na kiseonik i toksične produkte njegove nekompletne redukcije je različita. Smatra se da izlaganje anaeroba kiseoniku indukuje produkciju enzima antioksidativne odbrane.

U sklopu normalne flore ljudskog organizma nalazi se veliki broj anaerobnih bakterijskih vrsta. U odnosu na druge mikroorganizme anaerobne bakterije predstavljaju dominantnu floru. Normalnu floru usne duplje čini nekoliko stotina vrsta bakterija pri čemu je odnos anaerobnih prema aerobnim bakterijama 10:1, dok je u gingivalnom sulkusu odnos ovih bakterija 1000:1. Flora gonjih partija digestivnog trakta razlikuje se u odnosu na floru donjih partija. Tako se u želucu i proksimalnom delu tankog creva nalaze uglavnom mikroorganizmi prisutni u usnoj duplji. U donjim partijama digestivnog trakta prisutno je preko 500 vrsta bakterija, pri čemu najčešće prisutne anaerobne bakterije predstavljaju *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, *Clostridium* u odnosu na aerobne 100-1000:1. U satavu flore vagine anaerobne i aerobne bakterije se nalaze u odnosu 10:1 a dominantnu anaerobnu floru čine gram pozitivne koke i laktobacili.

Infekcije anarobnim bakterijama mogu biti egzogene i endogene. Kod egzogenih do infekcije dolazi unosom uzročnika (toksina) u organizam, dok su endogene infekcije uzrokovane anerobnim bakterijama koje su deo normalne flore.

Vrste roda *Clostridium* predstavljaju najčešće uzročnike egzogenih infekcija. Neke vrste mogu izazvati i endogene i egzogene infekcije (*C.perfringens*, *C.difficile*, *C.sordellii*, *C.septicum*). Oboljenja izazvana klostridijama posledica su delovanja njihovih toksina: botulizam - *C.botulinum* (*C.baratii*, *C.butyricum*); tetanus - *C.tetani*; gasna gangrena, celulitis, fascitis - *C.perfringens*, *C.novyi* i *C.septicum* (ređe *C.sordellii*, *C.histolyticum*); dijareja kao posledica primene antibiotika ili hospitalne infekcije - *C.difficile*; trovanje hranom, nekrotizirajući enterokolitis - *C.perfringens*.

Tetnus i botulizam predstavljaju oboljenja koja nastaju kao posledica delovanja neurotoksina. Do tetanusa dolazi usled pasivnog unošenja spora *C.tetani* prilikom povređivanja. Tetanigene rane su duboke rane gde se stvaraju anaerobni uslovi, mada se u oko 30% slučajeva radi o minornim traumama. Iz spora germinišu bacili koji luče egzotoksin. Sinteza tetanusnog toksina je kodirana genima plazmida i poseduje izražen afinitet za inhibitorne neurone. Tetanospazmin deluje proteolitički na sinaptobrevin, protein koji je neophodan za proces oslobađanja inhibitornih neurotransmitera (gama aminobuterna kiselina, glicin) iz vezikula. Posledica delovanja toksina su spastične paralize. *C.tetani* produkuje jedan antigenski tip toksina a prevencija se sprovodi imunizacijom.

Botulizam je uzrokovan botulinskim toksinom koga produkuje *C.botulinum*. Definisano je sedam antigenski različitih tipova toksina A, B, C, D, E, F i G. Pri tom, jedan soj najčešće produkuje samo jedan tip toksina ali su opisani sojevi koji produkuju dva tipa toksina ili produkuju jedan tip a poseduju i gene za

drugi. Botulizam kod ljudi izazivaju tipovi A, B, E, F i G. Tip E proizvodi *C.butyricum*, tip F *C.baratii*, a tip G, po skorijoj reklasifikaciji, *C.argentine*.

Svi tipovi toksina imaju isti mehanizam delovanja, sprečavaju oslobađanje acetilholina iz vezikula dovodeći do razvoja mlitave paralize. Oslobađanje acetilholina je blokirano proteolitičkim delovanjem toksina na kompleks transportnih SNARE proteina koga čine sinaptobrevin, SNAP-25 (synaptosomal associated proteins of 25kDa) i sintaksin. Određeni serotipovi deluju na različite proteine: tip A se vezuje za SNAP-25, tip B za sinaptobrevin. Pored najčešćeg oblika botulizma nastalog unosom hrane koji je opisan još krajem XVIII veka, ređe se javlja kao botulizam odojčadi i botulizam rane. Opisani su i retki slučajevi intestinalnog botulizma kod osoba kolonizovanih vrstom *C.botulinum* sa funkcionalnim ili anatomskim poremećajima creva, inhalacioni botulizam (opisan kod laboratorijskih radnika koji su udisali toksin u vidu aerosola), i jatrogeni botulizam.

Pored tetanusa i botulizma, teške infekcije kod ljudi izazivaju klostridije uzročnici gasne gangrene. Infekcije vrstom *C.perfringens* najčešće nastaju kao posledica masivnih trauma. Najznačajniji faktor virulencije je alfa toksin koji dovodi do agregacije trombocita i formiranja tromba. Usled loše perfuzije stvaraju se anaerobni uslovi neophodni za razmnožavanje klostridija. *C.septicum* može biti uzročnik gasne gangrene kod bolesnika sa neutropenijom ili malignim bolestima gastrointestinalnog trakta. *C.sordellii* i *C.novyi* opisani su kao uzročnici infekcija nastalih posle porođaja i abortusa.

Endogene infekcije izazvane nesporogenim anaerobnim bakterijama mogu imati različite kliničke manifestacije – formiranje apscesa, nekroza tkiva, sepsa. Izazvane su bakterijama koje su deo normalne flore i uglavnom male virulencije. Često su infekcije mešovite i razvijaju se kod osoba sa hroničnim i malignim oboljenjima. Najznačajniji faktori virulencije su sposobnost adherencije, produkcija enzima i kapsule. Vrste rodova *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, i *Fusobacterium* dominiraju na mukoznim površinama ljudskog organizma a produkcija kolagenaza, neuraminidaza, DN-aza, proteinaza omogućava prodor ovih bakterija u sterilna tkiva. Gram pozitivne anaerobne koke koje se najčešće izoluju kod humanih infekcija pripadaju rodovima *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus* i *Peptoniphilus*. U rodovima *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus* i *Peptoniphilus* nalaze se vrste koje su ranije bile u rodu *Peptostreptococcus* (na pr. *Finegoldia magna*, *Parvimonas micra*, *Anaerococcus tetradius*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*). Uglavnom izazivaju mešovite infekcije. Najčešće izolovane anaerobne koke u čistoj kulturi predstavljaju *F.magna*, *P.micra*, *Peptoniphilus harei* i *Peptostreptococcus anaerobius*.

LITERATURA

1. Finegold SM, George WL, Mulligan ME. Anaerobic infections. Part II. *Did Mon* 1985;31:1.
2. Schottmueller H. Allgemeinen krankenhaus hamburg-eppendorf. *Mitt Grenz Med Chir* 1910;21:450.
3. Lemierre A. On certain septicemias due to anaerobic organisms. *Lancet* 1936;1:701-3.
4. Brioukhanov AI, Netrusov AI. Catalase and superoxide dismutase: distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. *Biochemistry* 2004;69:949-62.
5. Brioukhanov AI, Netrusov AI. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2007;43:567-82.
6. Evaldson G, Heimdahl A, Kager L, Nord CE. The normal human anaerobic microflora. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1982;35:9-15.
7. Hassel B. Tetanus: Pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. *Toxins* 2013;5:73-83.
8. Lindstrom M, Korkeala H. Laboratory diagnosis of botulism. *Clin Microb Rev* 2006;298-314.
9. Stevens DL, Aldape MJ, Bryant AE. Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe* 2012;254-59.
10. Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci-commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2013;37:520-53.

IMUNOPATOGENEZA INFEKCIJE *H. PYLORI*^{1,2} Biljana Miljković Selimović, ¹Tatjana Babić, ^{1,2}Branislava Kocić¹Referentna laboratorija za *Campylobacter* i *Helicobacter*, Institut za zaštitu zdravlja, Niš, Srbija²Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, Srbija

Apstrakt: Mada je poznato da je *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) naselio želudac čoveka još u vreme migracije savremenog čoveka iz Afrike pre 58 000 godina (Linz, et al., 2007), ako ne i ranije, kao i to da je verovatno više od polovine svetske populacije inficirano *H. pylori*, još uvek se ne zna zašto od pojedinih tipova bolesti oboljeva samo mali broj ljudi. Sigurno je da u patogenezi bolesti, kao ključni činioci učestvuju ne samo faktori virulencije *H. pylori* već i predispozicija organizma zajedno sa imunskim odgovorom na ovaj patogen. Stoga se smatra da infekcija *H. pylori* i ishod bolesti zavise od složene interakcije između bakterije, domaćina i faktora okoline. Sa druge strane, želudačni karcinom i peptički ulkus dovode do smrti više od milion ljudi svake godine što ukazuje na značaj koji ima ova infekcija. Nažalost, reinfekcija koja značajno doprinosi mortalitetu i morbiditetu se češće javlja u manje razvijenim zemljama. Ispitivanje genoma *H. pylori* ukazalo je na izražene razlike u genomu kod sojeva istog specijesa, na razlike u ishodu bolesti izazvane ovim sojevima, na različitost u strukturi populacije *H. pylori* i na njegove evolutivne promene. Poznato je da svaki soj poseduje vakuolizirajući toksin (vacuolating cytotoxin A, *vacA*), a da samo mali broj sojeva poseduje i ostrvce patogenosti povezano sa citotoksinom (cytotoxin-associated gene pathogenicity island, *cagPAI*). Drugi faktori patogenosti obuhvataju: athezine, faktore invazivnosti (enzime) i proinflamatorni lipopolisaharid (LPS). *H. pylori* kolonizuje mukožu želuca, aktivira Toll-like i Nod-like receptore i obično izaziva želudačni T-helper 1/17 (Th1/Th17) tip imunskog odgovora. Smatra se da sekrecija peptidil-prolil-cis-trans-isomerase *H. pylori* predstavlja ključni factor koji dovodi do inflamacije izazvane citokinima Th17 podgrupe. Hronična infekcija *H. pylori* nastaje kolonizacijom jedine niše jedinog domaćina i na taj način *H. pylori* izbegava mnoge mehanizme ćelijskog imunskog odgovora. Moguća pojava Th2 odgovora neće pružiti dodatnu zaštitu, već će ukazivati na nepovoljan tok bolesti. Mada je infekcija *H. pylori* u početku bila povezivana samo sa gastroduodenalnim traktom, pokazano je da ima izvesnu ulogu u etiologiji nekih ektragastričnih bolesti. Kod

idiopatske trombocitopenijske purpure, sideropenijske anemije i deficijencije vitamina B12 se preporučuje da se izvrši dijagnoza infekcije *H. pylori*. Postoje i druga stanja, kao što su bolesti kardiovaskularnog, nervnog i respiratornog sistema kao i bolesti kože u kojima infekcija *H. pylori* ima moguću etiološku ulogu. Smatra se da *H. pylori* ima potencijalnu da dovede do gastrointestinalnih neoplastičnih bolesti, kao što su kolorektalni karcinom i karcinom pankreasa.

Ključne reči: *Helicobacter pylori*, imunopatogeneza

Bez obzira na to što su spiralne bakterije zapažene u želucu životinja i čoveka pre više od sto godina, dugo se smatralo da se radi o kontaminaciji ili artefaktima. Tek su radovi [Marshall](#)-a, [Warren](#)-a i njihovih saradnika ukazala na mikroorganizme koji ne samo da kolonizuju želudac, već i izazivaju oboljenja, koja mogu biti veoma teška (Marshall et Warren 1984).

Helicobacter pylori (*H. pylori*) pripada kraljevstvu Bacteria, filumu Proteobacteria, klasi Epsilonobacteria, redu [Campylobacterales](#), porodici Helicobacteraceae (Goodwin *et al.* 1989; Solnick *et al.*, 2001). Ovaj mikroorganizam je Gram-negativan, pokretljiv bacil koji ne formira spore, ima oblik latiničnog slova "S", a veličina mu se kreće od 0,5-0,9 µm u širinu do 2-4 µm u dužinu, sa nekoliko navoja koji se mogu zapaziti *in vivo*. Posедуje do šest flagela koje se nalaze na jednom polu. Razmnožava se u mikroaerofilnoj sredini na podlogama sa krvlju na 37°C, obično 3-5 dana. Daje sivkaste, kružne kolonije veličine 1-2 mm (Owen, 1998).

RIZIK INFEKCIJE

Ispitivanje prevalencije infekcije *H. pylori* kod odraslih osoba i dece u opštoj populaciji, kao i u definisanim zajednicama, ukazalo je na postojeći rizik za nastanak infekcije *H. pylori*. Jedna japanska studija istakla je ulogu porodice i njenih starijih članova na porodičnu transmisiju *H. pylori*. Pritom, infekcija ne mora obavezno da nastane kod dece imajući u vidu broj osoba sa prolaznom infekcijom. Takođe je zapaženo da posle eradikacije, relaps u prvoj godini verovatno predstavlja povratak prethodne infekcije, dok je u kasnijoj dobi verovatnije da se radi o reinfekciji novim sojem ili sojevima (Calvet *et al.*, 2013). Novija saznanja

ukazuju da je prisustvo bakterijske DNK u usnoj duplji važan činilac transmisije ove bakterije sa osobe na osobu (Ierardi et al., 2014). Sa druge strane, prenos sa čoveka na životinje je veoma redak i do sada je opisan samo u koloniji malog australijskog torbara, *Sminthopsis macroura*, u jednom istraživačkom centru (Every et al., 2011).

Želudačni karcinom je i dalje pretnja zdravlju, kao treći vodeći faktor smrti usled karcinoma, kod oba pola, širom sveta. Novije analize su pokazale da su trendovi mortalita u periodu od 1980. do 2011. značajno opali u svim zemljama, ali je pad u SAD, EU i nekoliko drugih većih zemalja bio manjeg obima u poređenju sa prethodnim periodom (Venerito et al., 2014). Pošto prevalencija infekcije u razvijenim zemljama pada nešto sporije nego ranije, ipak značajan deo populacije ostaje inficiran i eventualno podložan ozbiljnoj bolesti. Reinfekcija se češće javlja u manje razvijenim zemljama. Ako se uzmu u obzir i želudačni karcinom i peptički ulkus, oni dovedu do smrti više od milion osoba svake godine. Incidencija želudačnog karcinoma je najviša u populaciji sa visokom prevalencijom infekcije. Testiranje i lečenje određene populacije je efikasan način prevencije karcinoma želuca. Sa druge strane peptički ulkus se smatra najčešćim uzrokom smrti bolesnika koji su primljeni na odeljenje urgentne hirurgije (Axon, 2014). Razloge za ovakvu prilagođenost *H. pylori* svom prirodnom domaćinu, kao i za nastanak bolesti koje životno ugrožavaju veliki broj ljudi nalaze se verovatno i u genomu *H. pylori* kod koga je otkrivena značajna raznovrsnost, kao i u strukturi bakterijske populacije i evolutivnim promenama koje se javljaju kod bakterije. Visoki stepen homolognih rekombinacija doprinosi povećanju različitosti genoma *H. pylori*. Nove metode ispitivanja populacione strukture *H. pylori* dovele su do otkrivanja novih subpopulacija. Pošto je obim raznolikosti pula gena *H. pylori* postojao sve upečatljiviji, predloženo je čak i postojanje pseudospecijesa. (Ahmed et al., 2013).

PATOGENOST

Infekcija *H. pylori* izaziva oboljenja želuca koja se mogu manifestovati kao nekoliko vrsta nemalighnih oboljenja ili kao pojava malignih bolesti. U oboljenja koja nemaju maligni karakter spadaju gastritis, peptični ulkus, gastroezofagealni refluks, želudačni polipi, gastritis indukovani nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (aspirin) i funkcionalna

dispepsija (Furuta et Delchier, 2009). Poznato je da je *H. pylori* svrstan u kancerogene prvog reda (IARC 1994) pa stoga ne iznenađuje pojava želudačnog karcinoma i limfoma želudačne sluzokože (mucosa associated lymphatic tissue, MALT).

Ishod bolesti izazvane infekcijom *H. pylori* zavisi od složenih odnosa između bakterije, domaćina i faktora okoline. Zahvaljujući brojnim faktorima kolonizacije omogućen je opstanak *H. pylori* u želucu čoveka. Pritom, ovi faktori mogu da se menjaju da bi se bakterija prilagodila promenljivim uslovima unutar domaćina zahvaljujući ulozi ostrvca patogenosti *cagA*, vakuolizirajućeg toksina *vacA*, c-glutamil-transpeptidaze, proteinskih struktura na površini bakterije, interakciji sa domaćinom i ulozi želudačne mikroflore (de Bernard M et al., 2014). Takođe su važni mehanizmi kojima faktori virulencije upravljaju odgovorom domaćina indukujući epigenetske promene, autofagiju i utičući na oksidativni stres (Cid et al., 2013).

FAKTORI VIRULENCIJE

Jedan od faktora virulencije koji možda utiče na to da *H. pylori* ima ekskluzivno jednog domaćina i koji utiče na različiti ishod bolesti može biti i specifična endotoksična aktivnost bakterije. Endotoksin *H. pylori* ispoljava nedovoljnu fosforilaciju i nedovoljnu acilaciju lipida A: Stoga ima manju endotoksičnu aktivnost, a interakcija sa imunskim receptorima je značajno niža što može dovesti do hroniciteta. Molekuli *H. pylori* poseduju i epitope koji ukršteno reaguju sa ljudskim tkivom. Naime, postoji mimikrija sa Luis antigenima i nekim antigenima ABO krvnih grupa koji mogu biti uključeni u procese zapaljenja, želudačne atrofije i kancerogeneze (Moran, 2010).

Faktori virulencije *H. pylori* su brojni. Oni obuhvataju kako faktore atezije, tako i faktore invazije, produkciju toksina i prisustvo ostrvca patogenosti. Faktori atezije omogućavaju bakteriji da izbegne delovanje peristaltike, pa samim tim omogućavaju i kolonizaciju neophodnu za nastanak oboljenja. U njih spadaju: proteini spoljašnje membrane (outer membrane proteins, OMPs), atezioni proteini krvnogrupnih antigena (blood group antigen binding adhesion protein, BabA), spoljašnji inflamatorni atezioni protein (outer inflammatory protein adhesion, OipA), atezioni faktor koji se vezuje za sijalinsku kiselinu (sialic acid-binding adhesion,

SabA). Enzim koji bakteriji omogućava delimičnu zaštitu od kiselog pH je ureaza, dok proteaze i elastaze favorizuju invaziju. Hronična infekcija *H. pylori* je moguća zahvaljujući tome što se bakterija u ljudskom organizmu nalazi samo na jednom mestu i ima sposobnost izbegavanja imunskog odgovora.

Do athezije ne dolazi samo zahvaljujući bakterijskim athezinima, već i njihovim receptorima, kao što su antigeni krvnih grupa, posebno Lewis b (Le^b) antigen, specifičnim receptorom za želudačne epitelne ćelije (Kusters et al., 2006).

Smatra se da svaki soj poseduje vakuolizirajući citotoksin, ali se ovaj toksin javlja u različitim formama, što utiče na razlike u virulenciji sojeva. Mehanizam delovanja *vacA* je indukcija stvaranja vakuola u gastričnim epitelnim ćelijama, kao i indukcija apoptoze u želudačnim ćelijama preko mitohondrijalnog puta. Sekvencioniranje DNK gena za *vacA* je pokazalo da postoji nekoliko regiona sa različitom metaboličkom aktivnošću. Do skoro su bili opisivani samo signalni (s) i srednji (m) region i njihovi podtipovi, kao i podtipovi koji nastaju njihovim kombinacijama, a sada su ova saznanja dopunjena i otkrivanjem i intermedijarnog (i) i delecionog (d) regiona. Zapaženo je da se između (s) i (m) regiona nalazi (i), a zatim (d) region (Karlsson et al., 2012). Ovaj značajni polimorfizam *vacA* gena utiče na virulenciju sojeva. Smatra se da *s1/m1* podtip proizvodi veću količinu vakuolizirajućeg toksina od drugih podtipova. Takođe se smatra da sojevi sa *s2/m2* ne sekretuju vakuolizirajući toksin (Marie 2012). Za genotip *vacA s1/m2* se smatra da je odgovoran za nastanak gastritisa, kao i da postoji značajna korelacija između genotipa *vacA s1/m1* i peptičkog ulkusa odnosno želučanog karcinoma, kao težih posledica infekcije *H. pylori* (Marie, 2012).

Za razliku od gena *vacA*, ne poseduju svi sojevi gen za ostrvce patogenosti udruženo sa citotoksinom (cytotoxin-associated gene pathogenicity island, *cagPAI*). Sojevi koji ga poseduju su označeni kao cag^+ sojevi. Smatra se da je *cagA* kao najvažniji faktor virulencije *H. pylori* takođe uključen u rizik za nastanak karcinoma. *CagA* omogućava nastanak IV tipa sekrecionog sistema. Da bi u ćeliju domaćina dospelo vakuolizirajući citotoksin, *vacA*, zadužen je upravo IV tipa sekrecionog sistema (IV type secretion system, TFSS IV), što stvara uslove za izmene na nivou epitela sluzokože želuca i promenu metabolizma i arhitektonike

epitelnih ćelija želuca. Do fosforilacije proteina cagA dolazi na ostacima tirozina na nivou pentaaminokiselina Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA). Do sada su opisana četiri različita EPIYA motiva. Smatra se da veći stepen fosforilacije EPIYA nosi i veći rizik za nastanak karcinogeneze (Karlsson et al., 2012).

AKTIVACIJA UROĐENOG IMUNSKOG ODGOVORA

H. pylori indukuje oba tipa imunskog odgovora, i urođeni i specifični. Nakon kontakta sa ćelijama gastrične mukoze LPS aktivira TLR receptore na površini eotelnih ćelija, TLR2 u većoj i TLR4 u manjoj meri (Del Giudice et al., 2001). Flagelin *H. pylori* nema sposobnost aktivacije TLR5 (Andersen-Nissen et al., 2005), što mu omogućava delimično izbegavanje mehanizama odbrane domaćina. Smatra se da je sinteza citokina od strane monocita, dendritičnih ćelija i neutrofila posledica aktivacije TLR2 sa sledstvenom aktivacijom nuklearnog faktora (NF)- κ B i sintezom hemokina (IL-8) (Del Giudice et al., 2001).

STEČENI IMUNSKI ODGOVOR

Ćelijski imunski odgovor: Th1 i Th17

Indukcija urođenog imunskog odgovora aktivacijom TLR stimuliše nastanak specifičnog T-helper (Th) 1 imunskog odgovora. Izgleda da protein aktivisanja neutrofila (neutrophile activating protein, HP-NAP), koji omogućava nakupljanje neutrofila na mestu kontakta *H. pylori* sa sluzokožom, ima ključnu ulogu u nastanku Th1 odgovora. Smatra se da je stepen oštećenja mukoze u korelaciji sa infiltracijom neutrofila (Del Giudice et al., 2001).

Tokom kolonizacije, bivaju aktivirane posebne populacije CD4⁺ T-limfocita, Th1 i Th17. Pored drugih bakterijskih faktora, sekretovana peptidil-prolil-cis-trans-izomeraza *H. pylori* predstavlja ključni molekul koji vodi zapaljenju izazvanom Th17 citokinima. Tom prilikom se verovatno uspostavlja složena ravnoteža između *H. pylori* i faktora domaćina u želudačnoj niši odgovorna za hronični tok infekcije (D'Elios et al., 2014).

Infekcija *H. pylori* koja aktivira Th1 imunski odgovor dovodi do sinteze proinflammatoryh citokina: IFN- γ , IL-12, IL-18 i faktora nekroze tumora (tumor necrosis factor, TNF) - α . Step en gastritisa je u korelaciji sa ekspresijom TNF- α i IFN- γ . Peptički ulkus je, takođe, povezan sa lokalnim želudačnim Th1 ćelijskim imunskim odgovorom (Bergman et al., 2006). Snažan Th1 odgovor na nivou mukoze ne samo da omogućava dalje oštećenje gastrične sluzokože, već može da dovede i do atrofijskog gastritisa i želudačnog adenokarcinoma (Kusters et al., 2006). Novi podaci su pokazali da je sekrecija citokina Th1 podtipa, kod dece manje intenzivna u poređenju sa odraslim osobama. Najveći rizik za infekciju *H. pylori* predstavlja poreklo roditelja i broj onih koji brinu o deci u okruženju koje ima visoku prevalenciju infekcije. Postavljena je nova hipoteza o pozitivnoj korelaciji između infekcije *H. pylori* u detinjstvu i nastanka karcinoma u odraslom dobu, što ukazuje na važnost prevencije rane infekcije u endemskim područjima (Iwanczak et Francavailla, 2014).

Humoralni imunski odgovor

Pored ćelijskog imunskog odgovora, *H. pylori* indukuje i specifični humoralni odgovor, koji, nažalost, nema zaštitnu ulogu, dok ćelijska imunost ne samo da dominira u etiologiji bolesti, već utiče i na ishod oboljenja. U humoralnom imunskom odgovoru, dolazi do sinteze mukoznih sekretornih antitela IgA. Njihovo prisustvo u serumu može se detektovati kod 39% do 82% inficiranih bolesnika. Specifična serumska IgM antitela se retko nalaze, zato što svoj maksimum dostižu rano tokom infekcije. Većina inficiranih bolesnika sintetiše IgG (IgG1, IgG2 i IgG4) koji se pojavljuje približno četvrte nedelje i dostižu maksimum između 12. i 19. nedelje posle infekcije (Kusters et al., 2006).

ASIMPTOMATSKO NOSILAŠTVO

Asimptomatski hronični gastritis može da se javi kod jedne grupe pacijenata inficirane *H. pylori*. Kod njih, većina želudačnih T ćelija specifičnih za *H. pylori* pripada Th0 ćelijama, koje sekretuju obe grupe citokina i Th1 i Th2 tipa (D'Elia et al., 1997), a pri tom postoji mešoviti Th1- i Th2-ćelijski imunski odgovor sa održavanjem perzistentne kolonizacije bez nastanka klinički manifestne bolesti (Bergman et al., 2006). Moguće je da mehanizam kojim *H. pylori* perzistira na površini mukoze bez ikakve štete po domaćina predstavljaju određene fazne

varijacije *H. pylori* koje mogu da se vežu za specifične receptore na dendritičnim ćelijama (dendritic cells, DC), suprimirajući nastanak Th1 ćelija sintezom IL-10 (Bergman et al., 2004). Ove varijacije *H. pylori* koje se selektivno vežu za specifične DC nakon toga migriraju u želudačne limfne noduse u kojima, takođe, onemogućavaju razvoj Th1 iz Th0 (Bergman et al., 2006).

Jedna fazna varijacije *H. pylori* može reagovati sa posebnom grupom dendritičnih ćelija koje su nazvane DC-SIGN. Ove ćelije na svojoj površini poseduju C-tip lektina, koji predstavlja ćelijski površinski receptor na DC koje imaju sposobnost da hvataju i internalizuju antigene. Vezivanje *H. pylori* za DC-SIGN blokira diferencijaciju naivnih CD4⁺CD45RA⁺ T-ćelija u Th1 ćelije, dok varijante *H. pylori* koje se ne vezuju za DC-SIGN omogućavaju nastanak Th1 ćelija. Moguće je da dolazi do sakupljanja populacije *H. pylori* od strane nezrelih DC koje mogu da dospeju do želudačnog epitela i da dođe do selektivnog vezivanja za DC-SIGN onih bakterija koje eksprimiraju neke Lewis-antigene. Nakon vezivanja i fagocitoze *H. pylori*, the DC migriraju do drenirajućih želudačnih limfnih nodusa u kojima u potpunosti sazrevaju i prezentuju obrađene antigene T-ćelijama, utičući na ravnotežu između Th-1 i Th2 ćelija. Moguće je da na ovaj način nastaju mikro-niše sa ravnotežom Th1 i Th2 ćelija koje želudac čine manje neprijateljskom sredinom za kolonizaciju (Bergman et al., 2006). Nastanak patologije koja je povezana sa *H. pylori* u korelaciji je sa odnosom Th1/Th2 podtipova i pro/antinflamatornog odgovora na koga utiču genotipovi domaćina (Bergman et al., 2006).

ATROFIJSKI GASTRITIS I ŽELUDAČNI ULKUS

Mehanizam kojim *H. pylori* indukuje atrofiju želudačne sluzokože i nastanak ulkusa može biti povćana aktivacija regulatornih T ćelija (Treg) bakterijskim antigenima. T regulatorne ćelije su deo imenskog sistema koji suprimira imunski odgovor drugih ćelija. Ovo je važan mehanizam "self-check" ugrađen u imunski sistem da bi prevenirao prekomernu reakciju. Regulatorne T ćelije mogu biti: Th3 ćelije (TGFβ⁺, IL-10^{+/-}, IL-4⁻), Tr1 (IL-10⁺), CD4/CD25/Foxp3⁺T regulatorne (Treg) cells. Drugom regulatornom podgrupom T ćelija mogu da se smatraju Treg17 ćelije. CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorne T ćelije nazvane su i "onim koje se

prirodno javljaju ". Dodatnu supresorsku T ćelijsku populaciju čine pored Tr1, Th3, CD8+CD28- i Qa-1 T CD8+ ćelije (Josefowicz et al., 2012).

Ove ćelije omogućavaju da *H. pylori* izbegne ćelijski imunski odgovor. Međutim, ne samo da je gastritis izazvan *H. pylori* povezan sa akumulacijom Treg, već kod peptične ulkusne bolesti povećanje Treg u želudačnoj sluzokoži kontroliše inflamaciju koja omogućava perzistenciju bakterija. Bez obzira na sve, Treg ćelije imaju zaštitnu ulogu u sprečavanju nastanka izraženog zapljenja na nivou želudačne sluzokože, ali samim tim omogućavaju kolonizaciju želuca i progresiju infekcije *H. pylori* kod nastanka maligniteta (Kusters et al., 2006). Shodno tome, opadanje stope prevalencije *H. pylori* dovelo je do smanjenja incidencije i rekurencije krvarećih ulkusa. Stoga se preporučuje strategija nazvana "test and-treat" kod bolesnika sa istorijom krvarenja ulkusa i korišćenja NSAID i/ili primene aspirina (den Hollander et al., 2013).

H. PYLORI I POLIPI ŽELUCA

Ne iznenađuje činjenica da se kod cagA transgenih miševa mogu javiti gastrična epitelna hiperplazija, želudačni polipi i adenokarcinom želuca i tankog creva imajući u vidu da je cagA onkogeni protein. Cronkhite-Canada sindrom (CCS) čine multipni polipi, praćeni gubitkom čula ukusa, gubitkom kose i problemima sa rastom noktiju, a često se zapažaju i hronična dijareja i enteropatija praćena gubitkom proteina. Izazivač bolesti nije poznat, međutim eradikaciona terapija *H. pylori* kod jednog bolesnika sa CCS u Japanu, kod koga je dokazan *H. pylori* dovela je do regresije polipa i povlačenja kliničkog nalaza. Nije jasno, da li je ovaj soj posedovao cagA protein, mada ga većina sojeva u Japanu poseduje. Stoga se smatra da prisustvo cagA proteina može biti povezano sa nastankom želudačnih polipa (Furuta et Delchier, 2009).

H. PYLORI I DRUGA NEMALIGNA OBOLJENJA ŽELUCA

Tačna uloga *H. pylori* u etiologiji nekih želudačnih nemalighnih bolesti, kao što je funkcionalna dispepsija i dalje ostaje kontroverza. Novi mogući mehanizmi kojima *H. pylori* može izazvati dispeptične smetnje obuhvataju izmenu želudačnog motiliteta kao i abnormalnosti endokrinog sistema i izmenjenu sekreciju želudačne kiseline (Ierardi et al., 2014).

Sve je veći broj dokaza da prisustvo *H. pylori* nema efekte na simptome i efikasnost terapije kod bolesnika sa gastroduodenalnim refluksom (gastroesophageal reflux disease, GERD). Neke studije su, međutim, istakle da eradikacija *H. pylori* dovodi do poboljšanja kod bolesnika sa GERD-om, što ukazuje da terapija *H. pylori* kod njih nije kontraindikovana. Neke epidemiološke studije su pokazale da postoji inverzni odnos između infekcije *H. pylori* i astme i alergije, mada postoje i suprotna tumačenja (den Hollander et al., 2013).

MALIGNNE BOLESTI

H. pylori ima značajnu ulogu u nastanku dva tipa malignih bolesti: gastričnog karcinoma (GK) i MALT limfoma

Gastrični karcinom

Nastanak GK je složen proces u kome učestvuje više činioca i koji se odvija postepeno. Ovi činioci su faktori virulencije *H. pylori*, kao kancerogena I klase (IARC 1994); indukcija promena u prenošenju signala epitelnih ćelija, indukcija epigenetskih promena u epitelnim ćelijama delovanjem *H. pylori*, genetske promene i genski polimorfizam domaćina koji determiniše imunski odgovor domaćina, povećana aktivnost matriksmetaloproteinaza i sigurno i drugi, nedovoljno poznati mehanizmi.

Prihvaćeno je da se kancerogeneza odvija postepeno. U ovaj proces su uključeni i faktori okoline i genetski faktori. Akumulacija višestrukih genetskih i epigenetskih promena, koje mogu da aktiviraju onkogene i/ili inaktiviraju mehanizme supresije tumora, može da dovede do kancerogeneze. Smatra se da postoji povezanost sinteze nekih molekula, kao što su IL8, IL10, TNF- β , TP53 i PSCA, kao i genetske varijacije različitih gena, kao što su XPG, PLCE1, HFE, ERCC5, EZH2, DOC2, CYP19A1, ALDH2 i CDH1 sa rizikom za nastanak GK. Nekoliko microRNK je takođe povezano sa GK i njegovom prognozom. Polimorfizam nekih gena značajno doprinosi nastanku karcinoma, odnosno imunskom odgovoru, koji vodi nastanku karcinoma. Genotip TNF-A 308A omogućava povećano stvaranje TNF- α i povećava rizik za kancerogenezu; IL-10-haplotip GCC povećava ekspresiju IL-10 i vodi antiinflamatornom odgovoru. Veći broj proinflamatornih genotipova

izgleda da progresivno povećava rizik za nastanak želudačnog karcinoma (El-Omar et al., 2003).

Malignitet se javlja samo kada je osoba inficirana specifičnim sojevima *H. pylori* i kada se javi specifičan odgovor domaćina. Malignitet je povezan sa s1/m1 sojevima, a ponekad i sa s1/m2 koji poseduju i1, te sa s2/m2, koji poseduju isključivo i2. Stoga i-region može da posluži kao nezavisan marker za pojavu želudačnog karcinoma, a njegova tipizacija može biti dovoljna za identifikaciju svih patogenih formi vacA *H. pylori* pa se samim tim njegova identifikacija može primeniti u prevenciji ove bolesti (Rhead et al., 2007). Pored genetskih promena, epigenetski procesi su takođe uključeni u nastanak karcinoma i njegovu progresiju. Infekcija *H. pylori* može biti povezana sa procesom hipermetilacije, povećavajući stopu metilacije promotera kod p16, E-kaderina i proteinkinaza povezanih sa smrću kod nekancerozne želudačne sluzokože bolesnika sa karcinomom želuca (Kaise et al., 2008).

H. pylori, može da dovede do promena u prenošenja signala na nivou epitelnih ćelija, na taj način doprinoseći kancerogenom procesu. On oštećuje athezioni kompleks E-kaderin i β -katenin, dovodeći do aberantne aktivacije β -katenina, omogućavajući progresiju prekancerozne intestinalne metaplazije. Matriks metaloproteinaze (MMP) su porodica od devet ili više veoma homolognih Zn-zavisnih endopeptidaza koje destruiju većinu ekstracelularnog matriksa (Birkedal-Hansen et al., 1993) i imaju potencijal da oštete želučanu stromu i olakšaju bakterijsku invaziju. Njihova sekrecija može biti zavisna od prisustva cagA i nezavisna od njegovog prisustva. CagA i posebno EPIYA su neophodni za optimalnu ekstracelularnu aktivaciju signalima regulisanih kinaza (ERK kinaza), aktivaciju sekrecije MMP-1 i disregulaciju produkcije β -katenina (Ferreira et al., 2008).

Da bi se stimulisala pokretljivost ćelija GK, neophodna je kombinacija cagA-zavisnog i cagA-nezavisnog prenošenja signala. CagA-zavisno i cagA nezavisno prenošenje signala, zavisi od TFSS IV, a omogućeno je delovanjem Jun N-terminalne kinaze (JNK). B1-integrin i Src stimulišu pokretljivost kancerskih ćelija (Snider et al., 2008). Oba puta su neophodna i nijedan nije ponaosob dovoljan za ovaj proces. Prenosjenje signala u ćeliju nezavisno od cag A ukazuje da TFSS može imati mnogo

važniju ulogu nego samo transport *cagA* iz bakterije u ćeliju domaćina (Ferreira et al., 2008).

U procesu nastanka GK i apoptoza ima svoju ulogu. Ona može da dovede do smrti epitelnih ćelija, ali i ćelija GK. Na apoptozu može uticati genotip bakterije koja dovodi do infekcije. Mada sojevi *H. pylori* koji ne poseduju ostrvce patogenosti *cagPAI* mogu da indukuju ovaj process, pojava apoptoze indukovana ostrvcem *cagPAI* javlja se brže nego kod sojeva koji ne poseduju ovu strukturu (Minohara et al., 2007). Glavni put kojim *H. pylori* indukuje apoptozu u ćelijama želudačnog karcinoma zahteva aktivaciju kaspaza 3 i 9 (Zhang et al., 2007). Međutim, gen koji kodira β -katenin može da funkcioniše kao onkogen (Wang et al., 2008), povećavajući stvaranje β -katenina kod bolesnika sa malignitetom (Saldanha et al., 2004).

Kod kancerogeneze visok nivo ekspresije proinflamatornog citokina, IL-1 (IL-1 β) kao i povećana regulacija *IL1RN* (koji kodira antagonist receptora za IL-1 β) za posledicu imaju smanjenje sekrecije želudačne kiseline i povećaje rizika za nastanak atrofijskog gastritisa. Neki polimorfni tipovi IL-1 i grupa gena za TNF- α imaju nezaobilaznu ulogu u etiologiji karcinoma. Ovi događaji su povezani sa dominantnom kolonizacijom korpusa *H. pylori* i pojavom pangastritisa, kod osoba sa povećanim rizikom za kancerogenezu (El-Omar et al., 2000; Furuta et al., 2002). Genski polimorfizam anti-inflamatornog citokina IL-10 povezan je sa povećanim antiinflamatornim odgovorom ili sniženim nivoom sinteze IL-10 što favorizuje proinflamatorni odgovor (Kusters et al., 2006). Sa druge strane, kod GK, skretanje prema sintezi citokina Th2 podgrupe koji utiču na humoralni imunitet, može da se javi kada je bolest već napredovala. Povećana produkcija supresivnih citokina može da dovede do smanjenja citotoksičnog antitumorskog T-ćelijskog odgovora u želucu, doprinoseći progresiji tumora (Ferreira et al. 2008). U nastanku GK, neosporna je i uloga reulacije urođenog imunskog odgovora epitelnih ćelija sluzokože od strane domaćina i *H. pylori*. U ove procese su uključeni i interakcija *H. pylori* sa dendritičnim ćelijama, aktivacija inflamazoma i nastanak T ćelijskog odgovora i doprinos funkcije mikroRNK (Koch et al., 2013).

Imajući u vidu delovanje faktora okoline na nastanak GK, treba naglasiti da neke studije ukazuju na povezanost pojave GK i unosa voća, flavonoida, ukupnog antioksidativnog kapaciteta hrane i unosa zelenog

čaja. Gojaznost je takođe, povezana sa rizikom za nastanak GK kardije unošenjem gvožđa putem mesa. Potvrđeno je da postoji pozitivna korelacija između unosa zirnice, soli, odnosno ukiseljene i usoljene hrane i GK, dok je u odnosu na unos aspirina zabeležena negativna korelacija (Gonzalez 2013).

Ispitivanja preneoplastičnih promena želudačne sluzokože su ukazala da infekcija *H. pylori* i prisustvo antitela prema parijetalnim ćelijama želuca učestvuju u autoimunskom odgovoru, ali da se radi o različitim, nezavisnim putevima i mehanizmima koji dovode do hroničnog atrofijskog gastritisa. Nije dovoljno poznata efikasnost eradikacije *H. pylori* u prevenciji metahronih lezija posle endoskopske resekcije GK. Međutim, obavezna je primena endoskopije za otkrivanje ovih lezija u ranom stadijumu, kada one mogu biti tretirane na ovaj način. Primena antagonista receptora vaskularnog endotelnog faktora 2, je prvi biološki tretman koji omogućava preživljavanje kod bolesnika sa napredovalim GK posle primene hemoterapije prve linije. Ovaj antagonist se ispituje kod bolesnika sa GK koji u velikoj meri ekspimiraju signalni put HGF/c-MET. Očekuje se da u skorijoj budućnosti imunostimulativna monoklonska antitela koja imaju antineoplastične efekte budu nova mogućnost terapije ovakvih bolesnika (Venerito, 2014). Uz to ispitivanja supresornim genima za GK koji obuhvataju i moguće otkrivanje novih gena pružaju nadu za uspešan tretman ove bolesti (Figueiredo et al., 2013).

Ipak, najbolji pristup smanjenja smrtnosti od želudačnog karcinoma je sprovođenje prevencije. Visoka stopa incidencije teških želudačnih atrofijskih promena ističe značaj skrininga GK u osetljivoj populaciji. Potvrđeno je da postoji povezanost gastritisa indukovano *H. pylori* i povećanog rizika za nastanak neoplazmi kolona, ali uzročna veza ovih pojava tek treba da bude objašnjena (Venerito et al., 2013).

MALT limfom želuca

Kod želudačnog MALT limfoma, CD4+T ćelije stimulišu proliferaciju neoplastičnih B-ćelija. Ove B-ćelije sintetišu autoantitela i diferenciraju se u različitom stepenu u zrele plazma ćelije (Parsonnet et al., 2004). Mada sluzokoža želuca normalno ne sadrži limfno tkivo, MALT se javlja kao posledica kolonizacije *H. pylori*. Tom prilikom u ovom tkivu može da

nastane monoklonska populacija B-ćelija i da sporom proliferacijom formira MALT limfom (Kusters et al., 2006). Dalje, ispitivanja imunoproteoma su potvrdila da postoji različitost antigenskog profila sojeva *H. pylori*, usled neobično velike genetsku heterogenost kao posledice velikog broja mutacija i rekombinacija koje se odvijaju *in vivo* (De Reuse et Bereswill, 2007). Glavnim prediktorom za pojavu MALT limfoma predstavlja translokacija koja se javlja kod fuzije *API2-MALT1*. Translokacija t(11;18)(q21;q21) dovodi do pojave fuzionog transkripta funkcionalnog inhibitora apoptoze (apoptosis inhibitor 2, API2)-MALT1 (Ferreira et al., 2008) koji dovodi do supresije apoptoze (Kusters et al., 2006).

H. PYLORI I ZAPALJENJSKA BOLEST CREVA (INFLAMMATORY BOWEL DISEASES, IBD)

Smatra se da se učestalost hronične zapaljenjske bolesti creva (chronic inflammatory bowel diseases, IBD), Crohn-ove bolesti (Crohn's disease, CD) i ulceroznog kolitisa (ulcerative colitis, UC) povećala tokom poslednje dve decenije. Kod zdravih osoba postoji simbiotski odnos sa bakterijama koje naseljavaju njihov gastrointestinalni trakt, dok kod obolelih dolazi do izmene ravnoteže u populaciji normalne flore (Matharu et al., 2009). Kvantitativni i kvalitativni mikrobni dsbalans kod UC može da se definiše kao disbioza, a karakteriše ga povećanje količine enterobakterija u digestivnom traktu (Sasaki et Klapproth, 2012). Dok se sa jedne strane pojedine vrste iz roda *Helicobacter* okrivljuju za nastanak IBD (Kullberg et al., 2006), moguće je da *H. pylori* ima protektivnu ulogu (Ierardi et al., 2014).

Osobe koje imaju IBD imaju i veći rizik za nastanak karcinoma kolona, zbog neravnoteže i u urođenom i u stečenom imunskom odgovoru. Smatra se da u imunopatogenezi IBD učestvuju ćelije prirodne ubice (natural killer, NK), CD4+T, CD8+T i Treg ćelije. Zapaljenje i oštećenje sluzokože izazvani su povećanom sekrecijom inflamatornih citokina tokom aktivnog stadijuma bolesti i mogu biti započeti citotoksičnim delovanjem na komezalne bakterije. Indukcija sinteze inflamatornih citokina može biti posledica izmene ravnoteže između Treg i efektnih Th ćelija. Povišeni nivoi proinflamatornih CD4+T ćelija i izražena infiltracija CD8+T ćelija takođe su važni u patogenezi UC kod ljudi. Disfunkcija faktora transformacije i rasta β (transforming growth factor

(TGF)- β) u jednom ili više signalnih puteva je zapažena i kod IBD i kod karcinoma kolona ljudi. Pritom oštećenje jednog transkripcionog faktora utiče na pojavu kolitisa nakon infekcije nekim specijesima iz roda *Helicobacter* (McCaskey et al., 2012). Smatra se i da IL-23 ima ključnu ulogu prilikom indukcije kolitisa koji zavisi od T ćelija i da je neophodan za nastanak intenzivnog IBD. Sa druge strane, IL-12 ima ključnu ulogu u odbrani domaćina od intracelularnih mikroba (aktivacija NK ćelija i sinteza IFN- γ), pa samim tim verovatno ne učestvuje u nastanku zapaljenja kod stimulišući diferencijaciju u Th1 ćelije. U skorije vreme, IL-23 je identifikovan kao novi član porodice citokina IL-12, koga sekretuju aktivirane DC i makrofagi. IL-23 je najpre opisan kao citokin koji indukuje proliferaciju i sekreciju IL-17 od strane CD4+T ćelija i za koje je dokazano da intenzivno indukuju patološki imunski odgovor. Potvrđeno je da IL-17+ CD4+T ćelije predstavljaju podgrupu Th ćelija (Th17 ćelije) koja proizvodi proinflamatorne citokine, IL-6 i TNF- α (Kullberg et al., 2006). CD4+T ćelije koje stvaraju IL-17 same mogu da indukuju i autoimunska reaktivnost tkiva. Moguće je da IL-23 utiče na pojavu i IFN- γ i IL-17, koji sinergistički započinju teško zapaljenje na nivou intestinalne mukozne (Kullberg et al., 2006).

H. PYLORI I EKSTRAGASTRIČNE BOLESTI

Infekcija *H. pylori* je najpre bila povezivana samo sa nekim gastroduodenalnim bolestima. Dalja ispitivanja su pokazala da postoji moguća etiološka uloga *H. pylori* kod nekoliko ekstraželudačnih bolesti. Stoga se preporučuje dijagnoza infekcije kod idiopatske trombocitopenijske purpure, sideropenijske anemije i deficijencije vitamin B12. Postoje i druga stanja kao što su kardiovaskularne, neurološke, dermatološke i respiratorne bolesti sa kojima je *H. pylori* možda povezan. Novija saznanja ukazuju da se njegova etiološka uloga može pripisati i gastrointestinalnim neoplazijama kao što je kolorektalni karcinom i karcinom pankreasa. Predloženi su različiti mehanizmi njegovog delovanja, počev od indukcije inflamacije niskog intenziteta pa sve do uloge molekularne mimikrije (Franceschi et al., 2014). Sa druge strane, moguća je zaštitna uloga ovog mikroorganizma kod astme, multipne skleroze i mijelodisplastičnog sindroma (Moyaert et al., 2008). Kolonizacija *H. pylori* povezana je i sa smanjenjem cirkulišućih nivoa leptina, nezavisno od telesne mase, indeksa telesne mase i prisustva grelina. Prilikom eradikacije infekcije *H. pylori* dolazi do značajnog

porasta indeksa telesne mase, količine masti, opadanja nivoa cirkulišućeg grelina i povećanja nivoa leptina (Franceschi et al, 2014).

LITERATURA

1. Ahmed N, Loke MF, Kumar N, Vadivelu J. *Helicobacter pylori* in 2013: Multiplying Genomes, Emerging Insights. *Helicobacter* 2013; 18 (Suppl. 1): 1–4.
2. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(26): 9247-52.
3. Axon A. *Helicobacter pylori* and Public Health. *Helicobacter* 2014; 19 (Suppl. 1): 68–73.
4. Baele M, Decostere A, Vandamme P, Van den Bulk K, Gruntar I, Mehle J, Mast J, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Helicobacter baculiformis* sp. nov., isolated from feline stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58, 357-64.
5. Bergman MP, van Vliet SJ, van Bodegraven AA, Wirth HP, Kapsenberg ML, Vandenbroucke-Grauls CM, van Kooyk Y, Appelmelk BJ. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med* 2004; 200: 979-90.
6. Bergman M, Del Prete G, van Kooyk Y, Appelmelk B. *Helicobacter pylori* phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4, 151-9.
7. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(2):197-250.
8. Calvet X, Lazaro M-JR, Lehours P, Megraud F. Diagnosis and Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2013; 18 (Suppl. 1): 5–11.
9. Cid TP, Fernandez MC, Benito Martinez S, Jones NL. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2013; 18 (Suppl. 1): 12–7.
10. D'Elia MM, Czinn SJ. Immunity, Inflammation, and Vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2014; 19 (Suppl. 1): 19–26.
11. D'Elia MM, Manghetti M, Almerigogna F, Amedei A, Costa F, Burroni D, Baldari CT, Romagnani S, Telford JL, Del Prete G. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori* specific T cell clones from the antrum of chronic

- gastritis patients with or without peptic ulcer. Eur. J. Immunol. 1997; 27: 1751-55.
12. de Bernard M, Josenhans C. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2014; 19 (Suppl. 1): 11–8.
 13. De Reuse H, Bereswill S. Ten years after the first *Helicobacter pylori* genome: comparative and functional genomics provide new insights in the variability and adaptability of a persistent pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50, 165-76.
 14. Del Giudice, G., Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. Annu Rev Immunol 2001; 19: 523-63.
 15. den Hollander WJ, Sostres C, Ernst J. Kuipers EJ, Lanas A. *Helicobacter pylori* and Nonmalignant Diseases. Helicobacter 2013; 18 (Suppl. 1): 24–27.
 16. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyo G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature, 2000: 404; 398-402.
 17. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. Gastroenterology 2003; 124: 1193-201.
 18. Every AL, Selwood L, Castano-Rodriguez N, Lu W, Windsor HW, Wee JLK, Swierczak A, Marshal BJ, Kaakoush NO, Mitchell HM, Sutton P. Did transmission of *Helicobacter pylori* from humans cause a disease outbreak in a colony of Stripe-faced Dunnarts (*Sminthopsis macroura*)? Vet Res 2001;42: 26.
 19. Ferreira AC, Isomoto H, Moriyama M, Fujioa T, Machado JC, Yamaoka Y. *Helicobacter* and gastric malignancies. Helicobacter 2008;13 (Suppl. 1): 28-34.
 20. Figueiredo C, Garcia-Gonzalez MA, Jose C. Machado JC. Molecular Pathogenesis of Gastric Cancer. Helicobacter 2013; 18 (Suppl. 1): 28–33.
 21. Franceschi F, Annalisa T, Teresa DR, Giovanna D, Ianiro G, Franco S, Viviana G, Valentina T, Riccardo LL, Antonio G. Role of *Helicobacter pylori* infection on nutrition and metabolism. World J Gastroenterol 2014;20(36):12809-17.

22. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1 β polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 2002; 123: 92-105.
23. Furuta T, Delchier JC. *Helicobacter pylori* and Nonmalignant Diseases. *Helicobacter* 2009; 14 (Suppl. 1): 29-35.
24. Gonzalez CA, Sala N, Rokkas T. Gastric Cancer: Epidemiologic Aspects. *Helicobacter* 2013; 18 (Suppl. 1): 34-8.
25. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 397-405.
26. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans et al. *Schistosomes*, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.
27. Ierardi E, Goni E, Losurdo G, Di Mario F. *Helicobacter pylori* and Nonmalignant Diseases. *Helicobacter* 2014; 19 (Suppl. 1): 27-31.
28. Iwanczak B, Francavailla R. *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2014; 19 (Suppl. 1): 46-51.
29. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:531-64.
30. Kaise M, Yamasaki T, Yonezawa J, Miwa J, Ohta Y, Tajiri H. CpG island hypermethylation of tumoursuppressor genes in *H. pylori* infected non-neoplastic gastric mucosa is linked with gastric cancer risk. *Helicobacter*. 2008; 13: 35-41.
31. Karlsson A, Ryberg A, Dehnoei MN, Borch K, Monstein HJ. Association between cagA and vacA genotypes and pathogenesis in a *Helicobacter pylori* infected population from South-eastern Sweden. *BMC Microbiol* 2012;12:129.
32. Koch M, Meyer TF, Steven F. Moss SF. Inflammation, Immunity, Vaccines for *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2013; 18 (Suppl. 1): 18-23.
33. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, Cua DJ, Powrie F, Cheever AW, Maloy KJ, Sher A. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* 2006; 203(11): 2485-94.

34. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev 2006;19(3): 449-90.
35. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature. 2007; 45: 915-18.
36. Marie MA. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence genes and clinical outcomes in Saudi patients. J Korean Med Sci 2012; 27(2):190-3.
37. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 1: 1311-15.
38. Matharu KS, Mizoguchi E, Cotoner CA, Nguyen DD, Mingle B, Iweala OI, McBee ME, Stefka AT, Prioult G, Haigis KM, Bhan AK, Snapper SB, Murakami H, Schauer DB, Reinecker HC, Mizoguchi A, Nagler CR. Toll-like receptor 4-mediated regulation of spontaneous *Helicobacter*-dependent colitis in IL-10-deficient mice. Gastroenterology. 2009 ;137(4):1380-90.
39. Minohara Y, Boyd DK, Hawkins HK, Ernst PB, Patel J, Crowe SE. 2007. The effect of the cag pathogenicity island on binding of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells and the subsequent induction of apoptosis. Helicobacter 2007; 12: 583-90.
40. Moran AP. The role of endotoxin in infection: *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. Subcell Biochem 2010;53: 209-40.
41. Moyaert H, Franceschi F, Roccarina D, Ducatelle R, Haesebrouck F, Gasbarrini A. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection: other *Helicobacters*. Helicobacter 2008;13(Suppl. 1), 47-57.
42. Owen RJ. *Helicobacter*-species classification and identification. British Medical Bulletin 1998; 54 (1): 17-30.
43. Parsonnet J, Isaacson PG. Bacterial Infection and MALT Lymphoma. N Engl J Med 2004; 350(3): 213-5.
44. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. Gastroenterology 2007; 133: 926-36.
45. Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear β -catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. Br J Dermatol 2004;151(1): 157-64.

46. Sasaki M, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct*. 2012; 2012:704953.
47. Solnick JV, Vandamme P. Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. In: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics* (Eds. H.L.T. Mobley, G.L. Mendz, and S.L. Hazell). 2001: ASM Press, Washington (DC). Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2463/>
48. Venerito M, Nardone G, Selgrad M, Rokkas M, Malfertheiner P. Gastric Cancer—Epidemiologic and Clinical Aspects. *Helicobacter* 2014; 19 (Suppl. 1): 32–7.
49. Wang X, Goode EL, Fredericksen ZS. Association of genetic variation in genes implicated in the β -catenin destruction complex with risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17 (8), 2101-8.
50. Zhang H, Chang DC, Lan CH, Luo YH. *Helicobacter pylori* infection induces apoptosis in gastric cancer cells through the mitochondrial pathway. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22; 1051-6.

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA NEPETA NUDA

Dragoljub L. Miladinović*, Budimir S. Ilić, Branislava D. Kocić
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, Niš, Srbija

Apstrakt: Kombinovanje etarskih ulja i standardnih antibiotika je nov metodološki i strateški pristup u borbi protiv bakterijske rezistentnosti. Objašnjenje mehanizma antibakterijske aktivnosti zasnovane na interakciji etarskog ulja u kombinaciji sa standardnim antibiotikom nije jednostavno. Posebno je zahtevno objašnjenje mehanizma interakcija etarskog ulja i antibiotika, koja ispoljavaju antagonističke efekte. Imajući u vidu navedeno, cilj ovog rada bio je ispitivanje hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti etarskog ulja *Nepeta nuda*. Antibakterijska aktivnost 1,8-cineola, dominantne komponente etarskog ulja pojedinačno i u kombinaciji sa standardnim antibioticima tetraciklinom i streptomycinom je takođe ispitivana.

Etarsko ulje je izolovano metodom hidrodestilacije na Clavenger aparatu. Hemijska analiza etarskog ulja je realizovana metodom gasne hromatografije (GC i GC-MS). Antibakterijska aktivnost etarskog ulja, 1,8-cineola i antibiotika određena je metodom mikrodilucije, dok su antibakterijske kombinacije proučavane mikrodilucionom checkerboard metodom. Da bi se objasnio mehanizam antibakterijske aktivnosti testiranih antibiotičkih supstanci i njihovih kombinacija, korišćena je metoda molekularnog dokinga.

Oksidovani monoterpeni (57,8%) su dominantna klasa jedinjenja etarskog ulja sa 1,8-cineolom (46,0%), najzastupljenijom komponentom. Najveća antibakterijska aktivnost je zabeležena za odabrane antibiotike. Etarsko ulje je ispoljilo antibakterijsku aktivnost u intervalu od 1332,8 do 42649,6 µg/ml, dok je 1,8-cineol bio aktivan sa inhibitornim i baktericidnim koncentracijama u intervalu 5900,8 – 94412,8 µg/ml. Rezultati interakcija etarskog ulja i 1,8-cineola sa referentnim antibioticima ukazuju da je antagonizam dominantan efekat u svim kombinacijama.

Dominantna komponenta etarskog ulja *Nepeta nuda* je 1,8-cineol. Njegova antibakterijska aktivnost je niža u poređenju sa referentnim

antibioticima i etarskim uljem. Na osnovu rezultata molekularnog dokinga može se pretpostaviti da antagonizam, dominantan efekat u svim antibakterijskim kombinacijama, nije uzrokovan interakcijom sa istim target mestom, već je najverovatnije posledica narušavanja membranskog potencijala i protonskog gradijenta citoplazmatične membrane.

Ključne reči: *Nepeta nuda*, Checkerboard metoda, Molekularni doking.

UVOD

Kombinovanje etarskih ulja i standardnih antibiotika je nova strategija u borbi protiv bakterijske rezistentnosti (Miladinović i sar., 2013). Objašnjenje mehanizma antibakterijske aktivnosti zasnovane na interakciji etarskog ulja u kombinaciji sa standardnim antibiotikom nije jednostavno. Posebno je zahtevno objašnjenje mehanizma interakcija etarskog ulja i antibiotika, koje ispoljavaju antagonističke efekte. Ovo je i najverovatniji razlog da antagonističke interakcije nisu ozbiljnije proučavane (Wagner, 2011). Imajući u vidu navedeno, odlučili smo da pored konvencionalnih eksperimentalnih metoda primenimo i hemoinformatičke metode analize (Paul i sar., 2010).

Rod *Nepeta* je zastupljen sa 280 vrsta, koje se primenjuju u tradicionalnoj medicini, kao antibakterijski agensi, antispazmolitici, ekspektoransi, diuretici i antipiretici (Asgarpanah i sar., 2014). U Flori Srbije opisane su tri vrste, roda *Nepeta* (Diklić, 1974).

Polazeći od značaja vrsta roda *Nepeta*, pre svega kao korisnih antibakterijskih sredstava, cilj ove studije je bio ispitivanje hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti terpenoida *Nepeta nuda*, kao i njihove kombinacije sa standardnim antibioticima, tetraciklinom i streptomycinom. Antibakterijska aktivnost 1,8-cineola, dominantnog terpenoida etarskog ulja *N. nuda*, pojedinačno i u kombinaciji sa odabranim antibioticima je takođe proučavana. Da bi se objasnio mehanizam antibakterijske aktivnosti testiranih supstanci i njihovih kombinacija korišćena je *in silico* metoda molekularni doking.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal i hemikalije

Nadzemni deo *Nepeta nuda* je sakupljen avgusta 2011. godine na lokalitetu Suva planina, jugoistočna Srbija. Taksonomsku pripadnost populacije je determinisala dr. Marija Marković, sa Departmana za Biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Herbarijumski uzorak biljne vrste, pod brojem 16524 je deponovan na Departmanu za Botaniku, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Sve korišćene hemikalije i reagensi su bili visokog stepena čistoće (ACS Reagent grade), nabavljene u Sigma-Aldrich Chemical Company.

Izolovanje etarskog ulja

Osušeni i usitnjeni nadzemni deo *Nepeta nuda* je podvrgnut procesu hidrodestilacije na Clavenger aparatu u trajanju od 4 sata. Izolovano etarsko ulje je osušeno anhidrovanim natrijum-sulfatom i čuvano na temperaturi od 4 °C.

Hemijska analiza

Gasna hromatografija (GC)

GC i GC-MS analize etarskog ulja su urađene korišćenjem metoda, koje su već opisane (Miladinović i sar., 2014).

Antibakterijsko testiranje

Antibakterijska aktivnost etarskog ulja je ispitivana na pet laboratorijskih tipskih sojeva. Iz grupe Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dok je iz grupe Gram-pozitivnih bakterija selektovana *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Ovi sojevi su odabrani na osnovu njihove mogućnosti adaptacije i rezistencije na veći broj antibiotika, zbog čega su uzročnici najčešćih infektivnih bolesti.

Mikrodiluciona metoda i Mikrodiluciona Checkerboard metoda

Upotrebom mikrodilucione metode je određena minimalna inhibitorna koncentracija i minimalna baktericidna koncentracija etarskog ulja (CLSI, 2009). Mikrodiluciona checkerboard metoda se često koristi za proučavanje antimikrobnih kombinacija, u *in vitro* eksperimentima. U

prethodnim radovima su detaljno opisane korišćene metode (Miladinović i sar., 2013; Miladinović i sar., 2014).

Hemoinformatičke metode

Za određivanje afiniteta i energije vezivanja testiranih antibakterijskih supstanci za target mesta bakterija, primenjena je metoda molekularnog dokinga. Na osnovu definisanih struktura receptora, dostupnih u bazi Protein Data Bank (PDB, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) i primenom programa AutoDock Vina, određene su energetske najpovoljnije konformacije vezivanja ispitanih liganada (Trott i sar., 2011).

Rezultati analize dobijeni metodom molekularnog dokinga se odnose na energiju interakcije ligand-receptor (kcal/mol). Negativnije vrednosti afiniteta, ukazuje na veću verovatnoću i povoljnije interakcije antibiotika ili 1,8-cineola sa receptorima. Maksimalna koncentracija ispitivanih antibakterijskih supstanci u citoplazmatskoj membrani izračunata je u skladu sa publikovanom metodom (Neumann i sar. 2005).

REZULTATI I DISKUSIJA

Prinos etarskog ulja *N. nuda* iznosio je 0,6% (w/w). Na osnovu GC i GC-MS analize etarskog ulja identifikovano je 46 komponenata, koje predstavljaju 92,5% ukupno detektovanih komponenata. Oksidovani monoterpeni su dominantna klasa jedinjenja etarskog ulja (57,8%), sa najzastupljenijom komponentom 1,8-cineolom (46%), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Chalchat i sar., 1998). U sastavu seskviterpenskih ugljovodonika (20,4%), druge klase jedinjenja po zastupljenosti u ispitivanom ulju, dominira germakren D (6,8%).

Etarsko ulje je ispoljilo aktivnost u intervalu od 1332,8 do 42649,6 µg/ml. Dominantan terpenoid, 1,8-cineol je bio aktivan sa inhibitornim i baktericidnim koncentracijama u intervalu 5900,8 – 94412,8 µg/ml. Referentni antibiotici su bili najaktivniji, tetraciklin 16,0 do 256,0 µg/ml i streptomycin od 4,0 do 64,0 µg/ml. Na osnovu prikazanih rezultata, može se konstatovati da su vrednosti antibakterijskih koncentracija 1,8-cineola generalno veće, u poređenju sa antibakterijskim vrednostima koncentracija etarskog ulja. Može se zato pretpostaviti da bez obzira što je 1,8-cineol nosilac antibakterijske aktivnosti u najvećoj meri, manje zastupljene komponente mogu značajno doprineti antibakterijskoj aktivnosti etarskog ulja (Hendry i sar., 2009).

Tabela 1. Antibakterijska aktivnost kombinacija etarsko ulje *N. nuda*-antibiotik i 1,8-cineol-antibiotik predstavljena pomoću FIC i FIC_A indeksa ispitivanih supstanci

Bakterijski soj		FIC _A indeksi etarskog ulja <i>N. nuda</i> i 1,8-cineola								
		0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
<i>E. coli</i> ATCC 25922	¹ *	0,21	0,32	0,43	0,54	0,65	0,76	0,87	0,98	1,09
	² *	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,06	2,06	2,42
	³ *	0,21	0,32	0,43	0,54	0,65	0,76	0,87	0,98	1,09
	⁴ *	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60	2,80
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	¹ *	1,09	1,40	1,47	1,80	2,00	1,56	1,55	1,16	1,47
	² *	0,32	0,44	0,43	0,68	0,65	0,76	0,87	0,98	1,09
	³ *	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60	2,80
	⁴ *	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60	2,80
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	¹ *	1,09	1,04	0,95	1,24	0,95	1,08	1,04	1,16	1,47
	² *	0,43	0,44	0,69	0,68	0,65	0,76	0,87	0,98	1,09
	³ *	0,87	0,92	1,08	1,24	1,85	1,40	1,55	1,70	2,04
	⁴ *	1,20	1,40	1,47	1,52	1,55	1,72	1,55	1,70	2,04
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	¹ *	1,20	1,40	1,60	1,80	1,70	1,56	1,04	1,16	2,23
	² *	1,20	1,40	1,60	1,80	1,70	1,40	1,04	1,16	1,85
	³ *	0,65	0,68	0,82	0,82	0,80	0,92	1,04	1,16	1,47
	⁴ *	1,20	1,04	0,82	0,82	0,80	0,92	1,04	1,16	1,47
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	¹ *	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60	2,80
	² *	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20	2,40	2,60	2,80
	³ *	1,20	1,40	0,95	0,96	0,95	0,92	1,04	1,16	1,09
	⁴ *	0,87	1,04	0,69	0,82	0,80	0,92	1,04	1,16	1,47

Ispitivane kombinacije: ulje-tetracilin (¹); ulje-streptomycin (²*); 1,8-cineol-tetraciklin (³*); 1,8-cineol-streptomycin (⁴*).

Rezultati interakcija etarskog ulja i 1,8-cineola sa referentnim antibioticima su prikazani u Tabeli 1. Može se konstatovati da je antagonizam dominantan efekat u svim kombinacijama: 62,2% etarsko ulje-tetraciklin, 57,8% etarsko ulje-streptomycin, 44,4% 1,8-cineol-tetraciklin i 71,1% 1,8-cineol-streptomycin. Etarsko ulje eukaliptusa i njegova dominantna komponenta 1,8-cineol u kombinaciji sa hlorheksidin glukonatom ispoljava sinergistički efekat protiv *E. coli* i *S. aureus* (Hendry i sar., 2009).

Poznato je da se tetraciklin i streptomycin vezuju za 30S subjedinicu ribozoma, uzrokujući inhibiciju sinteze proteina bakterija. Razmatrano je nekoliko mesta vezivanja, uključujući primarnu lokaciju na 16S rRNA, protein S7 i protein S12 (Tabela 2). Prva faza aktivnog transporta

tetraciklina i streptomicina zahteva vezivanje njihovih katjonskih struktura, za anjonske komponente u ćelijskoj membrani. Sledeća faza je energetski zavisna i uključuje transport polarnih, pozitivno naelektrisanih struktura kroz citoplazmatičnu membranu i interakciju sa ribozomima. Energija za ovaj transport se obezbeđuje iz membranskog potencijala i protonskog gradijenta, koji su regulisani aktivnošću citohrom c oksidaze i ATP sintaze (Anderson i sar., 2012).

Najčešće objašnjenje mehanizma antibakterijske aktivnosti etarskih ulja su narušavanje strukture membrane bakterija, oštećenje membranskih proteina (npr. enzima), curenje ćelijskog sadržaja, smanjenje protonskog gradijenta i koagulacija citoplazme (Hylgaard i sar., 2012). Rezultati prikazani u Tabeli 2. ukazuju da je energija vezivanja 1,8-cineola za 30S receptore ribozoma značajno niža, u poređenju sa odabranim antibioticima. Ovi *in silico* rezultati kombinovani sa eksperimentalnim podacima (Tabela 1), ukazuju da dominantne antagonističke interakcije nisu uzrokovane interakcijom supstanci sa istim target mestom, već su najverovatnije posledica narušavanja membranskog potencijala i protonskog gradijenta citoplazmatične membrane (Sikkema i sar., 1994). Ova hipoteza se potkrepljuje podacima koji ukazuju na visok afinitet vezivanja 1.8-cineola sa citohrom c oksidazom i ATP sintazom. Imajući u vidu činjenicu da energija ATP-a, nije u potpunosti dovoljna za transport streptomicina do ribozoma i da je aktivnost ATP sintaze uslovljena membranskim potencijalom i protonskim gradijentom, možemo pretpostaviti da je citohrom c oksidaza primarni receptor vezivanja 1.8-cineola (Anderson i sar., 2012).

Tabela 2. Afinitet vezivanja ispitanih supstanci i receptora (kcal/mol)

	Receptor	PDB	Tetraciklin	Streptomicin	1,8-cineol
Ribozom 30S	16S rRNA ^a	1HNW	-6,8	-6,1	-3,5
	Protein S7	1HUS	-6,0	-5,9	-4,2
	16S rRNA ^b	1FJG	-7,1	-7,0	-4,1
	Protein S12	2OM7	-6,6	-6,1	-4,4
Ćelijska membrana	Citohrom c oksidaza	1QLE	-5,0	-4,1	-6,1
	ATP sintaza	1C17	-5,2	-4,2	-6,1

^{a)} 16S rRNA deo koordiniran tetraciklinom; ^{b)} 16S rRNA deo koordiniran streptomicinom.

ZAKLJUČAK

Dominantna komponenta etarskog ulja *Nepeta nuda* iz jugoistočne Srbije je 1,8-cineol. Njegova antibakterijska aktivnost je niža u poređenju sa referentnim antibioticima i etarskim uljem. Na osnovu rezultata molekularnog dokinga može se pretpostaviti da antagonizam, dominantan efekat u svim antibakterijskim kombinacijama, nije uzrokovan interakcijom sa istim target mestom, već je najverovatnije posledica narušavanja membranskog potencijala i protonskog gradijenta citoplazmatične membrane.

REFERENCE

1. Anderson RJ, Groundwater PW, Todd A, Worsley AJ. (2012) *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 1-378.
2. Asgarpanah J, Sarabian S, Ziarati P. (2014) Essential oil of *Nepeta* genus (Lamiaceae) from Iran: a review. *Journal of Essential Oil Research*, **26**, 1-12.
3. Chalchat JC, Petrovic SD, Gorunovic MS. (1998) Quantity and composition of essential oil of the wild plant *Nepeta nuda* L. from Yugoslavia. *Journal of Essential Oil Research*, **10**, 423-425.
4. CLSI M07-A08. (2009) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 1-65.
5. Diklić N. (1974) *Nepeta* L. In *Flora of the Republic of Serbia*. Vol. **6**, Josifović M. (Ed). Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, 372-376.
6. Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. (2009) Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**, 1219-1225.
7. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 1-24.
8. Miladinović DL, Ilić BS, Miladinović LC, Kocić BD, Ćirić VM, Stankov-Jovanović VP, Cvetković OG. (2013) Antibacterial activity

- of *Thymus pulegioides* essential oil and its synergistic potential with antibiotics: a chemometric approach. In *Recent Progress in Medicinal Plants: Essential Oils III and Phytopharmacology*. Vol. 38, Govil JN, Bhattacharya S. (Eds). Studium Press LLC, Houston, 101-136.
9. Miladinović DL, Ilić BS, Mihajilov-Krstev TM, Jović JL, Marković MS. (2014) *In vitro* antibacterial activity of *Libanotis montana* essential oil in combination with conventional antibiotics. *Natural Product Communications*, **9**, 281-286.
 10. Neumann G, Kabelitz N, Zehnsdorf A, Miltner A, Lippold H, Meyer D, Schmid A, Heipieper HJ. (2005) Prediction of the adaptability of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a second phase of a solvent for economically sound two-phase biotransformations. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6606-6612.
 11. Paul SB, Choudhury S. (2010) Molecular docking studies on the activity of naturally occurring pyranochalcones on the transcriptional regulator enzyme of *Pseudomonas putida*. *Open Access Bioinformatics*, **2**, 61-66
 12. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 8022-8028
 13. Trott O, Olson AJ. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, **31**, 455-461.
 14. Wagner, H. (2011) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, **82**, 34-37.

STRONGILOIDOZA KOD IMUNOKOMPROMITOVANIH BOLESNIKA

Džamić AM, Mitrović S, Čolović Čalovski I

Laboratorija za parazitologiju-mikologiju, Institut za mikrobiologiju i imunologiju,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, R Srbija

UVOD

Strongyloides stercoralis je crevna nematoda koja kod ljudi izaziva akutna i hronična oboljenja. Mada je prava prevalencija infekcije nepoznata, strongiloidoza je rasprostranjena u celom svetu, osim u oblastima sa hladnom i polarnom klimom. Procena je, da je preko 100 miliona ljudi inficirano ovim parazitom, a 50% inficiranih ima asimptomatsku infekciju. Neke virusne infekcije, imunosupresivna terapija, maligna oboljenja, hronične bolesti, kao što su dijabetes i opstruktivna bolest pluća, dovode do promena u imunskom sistemu domaćina koje, ukoliko postoji izloženost agensu, mogu da budu razlog povećane učestalosti infekcije i pojave teških oblika bolesti (1,2).

U životnom ciklusu ove nematode razlikuju se parazitske i slobodne generacije koje se smenjuju u zavisnosti od sredine u kojoj se parazit nalazi. Osobenost životnog ciklusa strongiloidesa je da ceo ciklus može da se zaokruži u organizmu čoveka zahvaljujući autoinfekciji (1). Infekcija čoveka nastaje transkutano prodorom infektivnih oblika parazita, filariformnih larvi. Venskom krvlju larve dospevaju u pluća, ascedentno migriraju traheobronhijalnim stablom i završavaju svoj razvoj u duodenumu. Akutna migracija parazita može da bude praćena plućnim (kašalj, hemoptizije) i crevnim tegobama (bolovi, dijareja, anoreksija, povraćanje, retko pojava ileusa). Ženke parazita u duodenumu polažu rabditiformne larve partenogenezom. Rabditiformne larve u crevima mogu da se razviju u infektivne filariformne larve i ponovo inficiraju domaćina, prodorom kroz sluzokožu rektuma (endogena autoinfekcija) ili kroz kožu perianalne regije (egzogena autoinfekcija). Autoinfekcija može da se održava godinama i razlog je hronične strongiloidoze. Step en autoinfekcije je obično nizak, osobe su obično asimptomatske, ali infekcija može da bude praćena intermitentnom eozinofilijom tokom migracije larvi kroz tkivo, kožnim eritematoznim promenama (*larva currens*) i povremenim crevnim tegobama (dijareja, povraćanje,

opstipacija). Autoinfekcija objašnjava perzistentne slučajeve strongiloidoze kod osoba koje ne žive u endemskim područjima (3).

Kod osoba sa izmenjenom funkcijom imunskog sistema, relativno asimptomatsko, hronično oboljenje može da se razvije u tešku bolest, hiperinfektivni sindrom i diseminovanu strongiloidozu. Oslabljene imunske odgovore na nivou gastrointestinalne sluzokože, usled sekundarne imunosupresije, dozvoljava ubrzanje autoinfektivnog ciklusa, odnosno neravnomerni prelaz rabditiformnih u filariformne larve na nivou duodenuma. Ovo stanje je praćeno povećanjem broja larvi koje migriraju kroz digestivni trakt i pluća i pojačanjem crevnih i plućnih tegoba i označava se kao hiperinfektivni sindrom (3,4). Zbog velikog broja larvi u tkivu, kod inficiranih može da dođe do pojave progresivne respiratorne insuficijencije, hemoragičnog pneumonitisa i ileusa. Lezije na sluzokoži creva nastale migracijom larvi omogućavaju prolaz crevnim Gram negativnim bakterijama u krv, pa se kod obolelih javlja sepsa, meningitis i pneumonija. Za razliku od hronične strongiloidoze, hiperinfektivni sindrom najčešće nije praćen perifernom eozinofilijom. Diseminovana strongiloidoza je stanje pojave larvi i/ili odraslih parazita u organima koji nisu uključeni u normalan životni ciklus parazita (3). U ovim slučajevima paraziti mogu da inficiraju jetru i bilijarni sistem, srce, tireoidnu i paratireoidnu žlezdu, pankreas, limfne čvorove, bubrege, prostatu, centralni nervni sistem i druge organe. Hiperinfektivni sindrom i diseminovana strongiloidoza su udruženi sa visokim stepenom letaliteta, oko 50%, koji čak, u nekim populacijama pacijenata sa visokim rizikom, iznosi 70-85% (2).

Imunski mehanizmi domaćina, urođeni i stečeni, verovatno imaju značajnu ulogu u regulisanju infekcije, jer do teških kliničkih oblika oboljenja dolazi uglavnom kada dođe do poremećaja ovih mehanizama. Slično drugim helmintima, strongiloides dominatno izaziva Th-2 imuni odgovor gde citokini, IgE antitela, eozinofili i mastociti učestvuju u oštećenju parazita i njihovom odstranjenju iz domaćina (5). Eozinofili imaju ulogu anigen-prezentujućih ćelija koje stimulišu produkciju specifičnih citokina Th-2 ćelija, uključujući IL-4 i IL-5. Interleukin 4 deluje na aktivirane B limfocite u smislu produkcije IgE i IgG4 antitela, a drugi citokini (IL-8) dovode do nagomilavanja granulocita, kao što su neutrofili koji pomažu u ubijanju larvi parazita. Antitela klase IgE omogućavaju degranulaciju mastocita i pojačavaju dalju migraciju

eozinofila, a IL-5 stimuliše sazrevanje i aktivaciju eozinofila. Oko 75% pacijenata sa hroničnom strongiloidozom imaju perifernu eozinofiliju ili povišena ukupna IgE antitela (4). Različita istraživanja su pokazala da se zaštitna imunost kod strongiloidoze ostvaruje preko specifičnih anti-*Strongyloides* antitela, komplementa i neutrofila u okviru ćelijske citotoksičnosti posredovane antitelima. Pokazano je da bolesnici sa teškom formom strongiloidoze imaju značajno snižen titar antitela i snižen broj eozinofila, u poređenju sa osobama sa asimptomatskom infekcijom. Antitela i granulociti imaju značajnu ulogu u kontroli infekcije, odnosno jedan prefinjen odnos između parazita i imunskog sistema domaćina omogućava dugotrajno preživljavanje parazita na nivou gastrointestinalnog sistema i održavanje infekcije. Oštećenje imunskih mehanizama domaćina i gubitak funkcije granulocita, neodgovarajući humoralni odgovor i odsustvo Th-2 citokina, dovodi do poremećaja u ravnoteži parazit-domaćin koja omogućava nastanak hiperinfektivnog sindroma i diseminovane bolesti.

STRONGYLOIDES I IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA

Opisani su brojni slučajevi hiperinfektivnog sindroma i diseminovane strongiloidoze kod bolesnika koji dobijaju kortikosteroide, pre svega kod onih koji imaju lupus, reumatoidni artritis, nefrotski sindrom, neinfektivne bolesti creva, bolesti krvi i druge autoimunske bolesti. Više istraživanja je ustanovilo da u ovim slučajevima rizik za pojavu teških oblika strongiloidoze postoji nezavisno od doze leka, dužine terapije i načina primene kortikosteroidnih preparata (1,2). Do pojave kliničkih znakova intenzivne autoinfekcije može doći već posle nekoliko dana posle uvođenja terapije, odnosno unutar 20 dana od uvođenja ili čak i nekoliko godina kasnije u slučajevima terapije održavanja. Moguća objašnjenja ove udruženosti su da glukokortikoidi (i) sprečavaju proliferaciju eozinofila, (ii) pospešuju apoptozu Th-2 ćelija, (iii) utiču na odgovor mastocita sluzokože na antigene strongiloidesa i (iv) pospešuju i ubrzavaju prelazak rabditiformnih larvi u filariformne larve i stimulišu "latentne" ženke parazita na partenogenezu (2). Neki autori, nezadovoljni objašnjenjem hiperinfekcije kao posledice delovanja samog domaćina (npr. usporena crevna pasaža i oštećenje imunskih mehanizama), smatraju da su hiperinfekcija, a možda i diseminacija rezultat promena u razvojnoj biologiji samog parazita, uključujući menjanje populacije rabditiformnih i filariformnih larvi usled pasaže kroz domaćina (eksperimentalne infekcije

na psima) i biogeografske karakteristike, odnosno postojanje različitih sojeva *strongiloidesa*. Naime, da bi se razumela patogeneza hiperinfektivnog sindroma i diseminovane bolesti treba objasniti kako može populacija parazita porasti od 100 do 300 000 jedinki i više u toku nekoliko dana ili meseci. Ključni faktor je ogromno povećanje broja presvlačenja, tj. broja L₂ larvi koje se presvlače u lumenu digestivnog trakta u L₃ oblike i zatim prelaze u adulte. Smatra se da tokom terapije glukokortikoidima njihovi metaboliti, koji su prisutni u serumu, mogu da zauzmu receptore na parazitu za koje se inače vezuju steroidni hormoni samog parazita neophodni za njihovo presvlačenje (1,3). Šta više, metaboliti glukokortikoida se, moguće, vezuju i za receptore na parazitu za koje se parazitski hormoni ne vezuju pod fiziološkim okolnostima zbog manje specifičnosti. Prethodna teorija, mada nedovoljno istražena, okrivljuje metabolite kortikosteroida za pospešivanje procesa presvlačenja odgovornog za pojavu hiperinfektivnog sindroma kod strongiloidoze.

Hiperinfektivni sindrom je udružen i sa primenom drugih imunosupresivnih lekova kao što su vinkristin, azatioprin, ciklofosamid, antitimocitni globulin, 6-merkaptopurin, metotreksat, bleomicin, adriamicin, melfalan, infiksumab, rituksimab, mikofenalat (2). Pokazano je da vinkristin smanjuje motilitet creva i pospešuje presvlačenje rabditiformnih larvi u invazivne filariformne larve, što povećava rizik domaćina za pojavu nekontrolisane autoinfekcije i njenog širenja. Međutim, u većini slučajeva davanja prethodnih lekova, bolesnici su istovremeno lečeni i kortikosteroidnim preparatima tako da je teško utvrditi vezu između *Strongyloides* hiperinfekcije i imunosupresivnog sredstva. Kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom koji su na dugotrajnoj terapiji niskim dozama prednizona utvrđena je pojava hiperinfektivnog sindroma posle uvođenja inhibitora TNF- α , što ukazuje da inhibitori TNF- α takođe učestvuju u pospešivanju autoinfekcije (6).

STRONGILOIDOZA I RETROVIRUSI

Kod bolesnika sa leukemijama/limfomima izazvanim HTLV-1 virusom postoji snažan Th-1 imunski odgovor sa izraženom produkcijom IFN- γ , odnosno IL-10 i TNF- β usled aktivacije regulatornih T limfocita. Ovi bolesnici su pod velikim rizikom da razviju težak oblik strongiloidoze ili neke druge sistemske helmintoze, s obzirom da HTLV-1 infekcija dovodi do imunskog pomeranja ka dominantom Th-1 imunskom odgovoru, dok

se smanjuje Th-2 odgovor (2,7). Na ovaj način se smanjiju koncentracije IL-4, IL-5, IL-13 i IgE antitela u serumu protiv strongiloidesa. Kod bolesnika sa istovremenom HTLV-1 i *Strongyloides* infekcijom utvrđen je značajno smanjen broj eozinofila u perifernoj krvi i snižen nivo IgE antitela u serumu, u poređenju sa bolesnicima sa strongiloidozom koji nisu inficirani i HTLV-1 virusom. Promene u funkcionisanju imunskog sistema (citokini, granulociti, produkcija antitela) udružene su sa čestom rekurentnom strongiloidozom, pojavom hiperinfektivnog sindroma i diseminovane strongiloidoze i čestim terapijskim neuspehom kod osoba inficiranih HTLV-1 virusom (7). Takođe, istraživanja pokazuju da istovremena infekcija ovim virusom i strongiloidesom ima uticaja na progresiju HTLV-1 infekcije i da parazit deluje kao važan činilac u nastanku leukemija/limfoma izazvanih ovim virusom skraćujući period latencije. Naime, parazit pospešuje replikaciju virusa i ugradnju HTLV-1 provirusne DNK u limfocite. Pokazano je i da su osobe koje imaju istovremenu infekciju i razviju leukemiju/limfom značajno mlađe, nego osobe koje nisu bile inficirane strongiloidesom.

TRANSPLANTIRANI BOLESNICI I *STRONGYLOIDES* INFEKCIJA

Hiperinfektivni sindrom i diseminovana strongiloidoza su opisane kod bolesnika kod kojih je transplaniran bubreg, srce, pluća, pankreas i jetra, kao i kod onih sa transplantacijom koštane srži. Ova stanja najčešće nastaju usled prisustva asimptomatske infekcije kod primaoca organa, ali opisani su slučajevi infekcije gde je do prenosa parazita došlo putem alografta. Kod transplaniranih osoba postoji poseban rizik u smislu progresije hronične infekcije u hiperinfekciju zbog pripreme bolesnika koja podrazumeva primenu imunosupresivne terapije pre transplantacije i hronične, dugotrajne terapije imunosupresivnim lekovima posle transplantacije da bi se sprečilo odbacivanje transplantata. Kod pacijenata kojima je rađena transplantacija koštane srži, hiperinfekcija i diseminovana bolest su opisani i kod autologne i alogene transplantacije, a smrtnost kod ovih bolesnika je i do 85% (1). Zbog prethodnog, kod transplantiranih pacijenata se prema današnjim uputstvima preporučuje skrining na *Strongyloides* pre transplantacije (8,9) . Savetuje se pregled seruma na prisustvo specifičnih anti-*Strongyloides* IgG antitela ELISA metodom kod (i) bolesnika koji žive u endemskim oblastima, (ii) onih koji su poreklom iz endemskih područja i/ili (iii) bolesnika sa značajnom

perifernom eozinofilijom. Neki protokoli preporučuju pregled više uzoraka stolice (3-5) davanja i primaoca na prisustvo larvi parazita, uključujući primenu metoda koncentracije larvi. Osobama sa pozitivnim skrining testom daju se antihelmintici prema uputstvu za hroničnu crevnu strongiloidozu.

DRUGA OBOLJENJA I STRONGILODOZA

Osobe sa proteinskom malnutricijom i hipogamaglobulinemijom imaju povećani rizik za nastanak hiperinfekcije i diseminovane strongilidoze (3). Teški oblici strongilidoze, uključujući povećan rizik od rekurentne bolesti, opisani su kod bolesnika sa primarnom imunodeficijencijom, kao i onih gde je gubitak proteina nastao usled nefrotskog sindroma, Kronove bolesti ili multiplog mijeloma. Maligna oboljenja pluća i digestivnog trakta, kao i primarni hematološki maligniteti, udruženi su sa pojavom *Strongyloides* hiperinfekcije pre započinjanja imunosupresivne terapije i pre uvođenja kortikosteroidnih preparata (2).

Lepromatozna lepra, koju karakteriše supresija ćelijske imunosti nije povezana sa hiperinfekcijom i diseminovanom bolešću, ukoliko nisu korišćeni kortikosteroidi za lečenje komplikacija (10).

Centar za kontrolu bolesti u Atlanti je uveo ekstraintestinalnu strongiloidozu kao jedan od dijagnostičkih kriterijuma kod bolesnika sa HIV infekcijom. Nasuprot ovim očekivanjima, broj diseminovanih infekcija kod ovih pacijenata nije bio veliki, čak i u područjima gde je učestalost ove infekcije izuzetno visoka, kao što su centralna Afrika i Brazil. Posle ovih saznanja, strongiloidoza je uklonjena sa liste indikativnih oportunističkih infekcija vezanih za AIDS. Pacijenti sa HIV infekcijom imaju visok rizik za nastanak crevne strongilidoze, ali ne i visok rizik za nastanak *Strongyloides* hiperinfekcije i diseminovane bolesti (2,3).

STRONGILODOZA U SRBIJI

Zemlje bivše SFRJ su od ranije poznate kao endemske oblasti za strongiloidozu, pre svega delovi Bosne & Hercegovine, Srbije (Posavina, Vojvodina) i Hrvatske (Slavonija) (11,12). U nekim zemljama EU

hiperinfektivni sindrom je opisan kod imunokompromitovanih osoba, migranata sa prostora bivše Jugoslavije (13).

U Srbiji ne postoje noviji podaci o učestalosti infekcije (serološki i/ili koprološki) u opštoj populaciji i po oblastima, ali su opisani pojedinačni slučajevi crevne, nekomplikovane strongiloidoze, kao i slučajevi hiperinfektivnog sindroma i diseminovane strongiloidoze (14-18). Teški oblici infekcije opisani su kod bolesnika sa lupus nefritisom, Kronovom bolešću, hroničnom idiopatskom trombocitopenijom i bolesnika od AIDS-a.

Ključne reči: Strongyloides, strongiloidoza, imunokompromitovani bolesnici, Srbija

LITERATURA

1. Keiser PB, Nutman TB. Strongyloides stercoralis in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev* 2004, 17: 208-217.
2. Weatherhead JE, Mejia R. Immune response to infection with Strongyloides stercoralis in patients with infection and hyperinfection. *Curr Trop Med Rep* 2014, DOI 10.1007/s40475-014-0032-9.
3. Kranjčić Zec I, Džamić A, Arsić V, Mitrović S. Strongiloidoza kod imunosuprimiranih pacijenata. Akademik Čedomir P Simić-Naučni skup posvećen 100 godišnjici rođenja. SANU i Jugoslovensko društvo parazitologa, Beograd, 1996, 47-58.
4. Buonfrate D, Requena Mendez A, Angheben A, Muñoz J, Gobbi F, Van Den Ende J, et al. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC Infect Dis* 2013, 13: 78.
5. Iriemenam NC, Sanyaolu OU, Oyibo WA, Fagbenro Beyioku AF. Strongyloides stercoralis and the immune response. *Parasitol Int* 2010, 59: 9-14.
6. Krishnamurthy R, Dincer HE, Whittemore D. Strongyloides stercoralis hyperinfection in a patient with rheumatoid arthritis after anti-TNF therapy. *J Clin Rheumatol* 2007, 13: 150-152.
7. Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzales E, Lopez G, et al. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to Strongyloides stercoralis antigen. *PLOS NTDS* 2009, 3: e456.

8. Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Curr Opin Infect Dis* 2012, 25: 458-463.
9. Levi ME, Kumar D, Green M, Ison MG, Kaul D, Michaels MG, et al. Considerations for screening live kidney donors for endemic infections: a viewpoint on the UNOS policy. *Am J Transplant* 2014, 14: 1003-1011.
10. De Souza JN, Machado PRL, Texeira MCA, Soares NM. Recurrence of *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with Hansen's disease: a case report. *Lepr Rev* 2014, 85: 58-62.
11. Milošević N, Kučera I, Radulović Š, Trnjak Z, Nožić D. Larva currens-osobena manifestacija strongiloidoze. *Vojnosanit Pregl* 1995, 52: 173-177.
12. Božikov V, Džebro S, Seidl K, Dominis M, Zambal Z, Škrabalo Z. Fatal "overwhelming" strongyloidiasis in an immunosuppressed patient. *Lijec Vjesn* 1996, 118: 23-26.
13. Müller A, Fätkenheuer G, Salzberger B, Schrappe M, Diehl V, Franzen C. *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with AIDS and non-Hodgkin lymphoma. *Dtsch Med Wochenschr* 1998, 123: 381-385.
14. Matić S, Popović R, Jovanović G, Dimitrijević T, Plečić M, Vukićević J. Prikaz slučaja strongiloidoze kod hematološkog pacijenta. VI Kongres medicinske mikrobiologije, Beograd, 2008, 199.
15. Radosavljević B, Ilić S, Lalošević D, Novak Striber M. Pojava strongiloidoze u ustanovi za mentalno retardiranu decu i omladinu Veternik. (Ik)
16. Suvajdžić N, Kranjčić Zec I, Jovanović V, Popović D, Čolović M. Fatal strongyloidosis following corticosteroid therapy in a patient with chronic idiopathic thrombocytopenia. *Haematologia* 1999, 29: 323-326.
17. Arsić Arsenijević V, Džamić A, Džamić Z, Milobratović D, Tomić D. Fatal *Strongyloides stercoralis* infection in a young woman with lupus glomerulonephritis. *J Nephrol* 2005, 18: 787-790.
18. Stanković Popović V, Džamić A, Janković A, Basta Jovanović G, Đurđević N, Mitrović M, i dr. Membranozni lupus nefritis neočekivanog toka-prikaz slučaja. 3 Kongres nefrologa Srbije, 2014, Beograd, 47.

PNEUMOCYSTIS JIROVECI – NOVA SAZNANJA O BIOLOGIJI, PATOGENEZI I DIJAGNOZI

Mitrović S, Čolović Čalovski I, Džamić AM

Laboratorija za parazitologiju-mikologiju, Institut za mikrobiologiju i imunologiju,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, R Srbija

Pneumocystis jirovecii, ranije poznat kao *Pneumocystis carinii*, odnosno *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* (*P. carinii* formae specialis *hominis*), prvi put je uočen od strane Chagas-a i potom Carini-ja 1909. Prvi humani slučajevi infekcije – pneumonije izazvane *P. carinii* (PCP) opisani su tokom II svetskog rata kod pothranjene novorođenčadi (Jirovec, Vanek). Sve do ere AIDS-a slučajevi PCP opisivani su sporadično da bi sa epidemijskom pojavom HIV infekcije PCP postala najčešća oportunistička infekcija tokom AIDS-a (1, 2). Iako je Frenkel još 1976. uočio da se humani sojevi razlikuju po nemogućnosti unakrsne infekcije pacova i čoveka, kao i drugačijoj serološkoj reaktivnosti humanih u odnosu na pacovske sojeve *P. carinii*, zbog čega je za humane uzročnike predložio naziv *P. jirovecii*, ovaj naziv nije zaživeo sve do 2000-tih i šire primene genetskih istraživanja ovog agensa (1,3). Ipak, predloženo je da se akronim PCP i dalje koristi, kao poznat među kliničarima, a na osnovu slova u dijagnozi **P**neumocystis **p**neumonia.

TAKSONOMIJA I BIOLOGIJA PNEUMOCYSTIS JIROVECI

Pneumocystis jirovecii je inicijalno klasifikovan kao protoza, a reklasifikovan u gljive na osnovu homologije rRNK sa drugim gljivama, što je danas najčešće korišćen marker filogenetske povezanosti (Edman, 1988). Na osnovu konstruisanih filogenetskih stabala utvrđena je srodnost sa *Sacharomyces (S.) cerevisiae* i *S.pombe* i svrstan je u askomicete (Stringer et al., 1989, 1998) (1). Danas se u rod *Pneumocystis* ubrajaju vrste: *Pneumocystis jirovecii* (humani patogen), *Pneumocystis carinii* (pacovi), *Pneumocystis wakefieldae* (pacovi), *Pneumocystis murina* (miševi). Utvrđeno je da *Pneumocystis* spp. mogu da kolonizuju i inficiraju i druge sisare (razne glodare, konje, pse, mačke, svinje, ovce, koze, majmune), ali za njih nisu posebno definisane vrste (ili se radi o *P. carinii*).

S obzirom da je nemoguće kultivisanje *Pneumocystis* spp. *in vitro* i *in vivo*, većina ultrastrukturnih i histohemijskih analiza vezana je za pneumocistis nađen u plućima čoveka i pacova. Sve do ranih godina AIDS epidemije postojala su samo rudimentarna znanja o biologiji, strukturi i antigenskoj građi *P. jirovecii*, a analizom sekvence 16S rRNA, kao i kodiranog proteina, započeta su intenzivna istraživanja ovog infektivnog agensa (Edman, 1988) (1). Pokazano je da su morfologija i životni ciklus različitih vrsta pneumocistisa identični, a da postoje ultrastrukturne i razlike u strukturi genoma vrsta, ali i u okviru vrste *P. jirovecii* da postoje različiti genotipovi (2).

Nemogućnost kultivisanja *Pneumocystis* spp. na veštačkim hranljivim podlogama, kao i kratkotrajno održavanje i sa malim prinosom na kulturi ćelija i tkiva, uticala je da se relativno kasno upozna životni ciklus ovog agensa (1,2). Sada su jasno definisane aseksualna faza ćelijske deobehaploidne trofičke forme tankih zidova, i seksualna faza (sporogeneza) sa nastankom oktetnih cista (askusa). Za razvojne stadijume još uvek se koristi dvojna nomenklatura. Češće su u upotrebi nazivi koji označavaju pripadnost protozoama: trofozoit, sporocit, cista – oktetna (sa osam elementarnih telašaca), dok se na osnovu pripadnosti gljivama razvojni stadijumi označavaju kao trofička forma, precista i cista.

ULTRASTRUKTURA *P. JIROVECII* I FAKTORI VIRULENCIJE

Saznanja o ultrastrukтури *P. jirovecii* govore da se sve razvojne forme karakterišu jedrom, jednom mitohondrijom i drugim organelama karakterističnim za eukariotske ćelije, citoplazmatskom membranom u kojoj nema ergosterola, a od površnih struktura nalaze se ćelijski zid, koji se sastoji od □ D-glukana i u manjoj meri hitina i N- acetilglukozamina, dok je najpovršniji gusti matrkis koji sadrži glavni površni glikoprotein (MSG) udružen sa kardiolipinom, fibronektinom i drugim molekulima domaćina (1,4).

Glavni faktori virulencije *P. jirovecii* su MSG i keksin (1,4). Velika antigenska varijabilnost MSG potiče od različito genetski rearanžiranih MSG gena i posttranskripcione obrade, a uloga MSG je u izbegavanju imunskog odgovora domaćina i u interakciji sa molekulima domaćina (fibronektin, vitronektin, surfaktanti), tj. u adherenciji za alveolarne epitelne ćelije pluća. Keksin je protein sa funkcijom proteaze, sličan serin

proteazama drugih gljiva i izgleda da ima ulogu u razgradnji surfaktanta u plućima što je direktno povezano sa patogeneзом oštećenja plućnog parenhima i disajne funkcije tokom infekcije.

KOLONIZACIJA ČOVEKA PNEUMOCISTISOM I EKOLOGIJA *P. JIROVECI*

P. jirovecii je ubikvitaran mikroorganizam. Čovek najverovatnije dolazi u kontakt sa ovim agensom već u ranom detinjstvu i to aerogenim putem, o čemu svedoči visoka prevalencija dokazane kolonizacije gornjih i donjih respiratornih puteva. Visoka seropozitivnost je posebno česta kod dece do 4 godine, čak u 83% (Piffer, 1978), a pretpostavlja se da je primarna infekcija asimptomatska ili blaga i ograničena na gornji RT (2). Dugotrajna kolonizacija ili latentna infekcija koja sledi, omogućena je i sposobnošću *P.jirovecii* da menja antigensku građu. Varijabilnost glavnog površnog glikoproteina (MSG) omogućava dugotrajno preživljavanje u organizmu zdravih, mada je moguće da se radi i o tranzitornoj kolonizaciji. U svakom slučaju kolonizacija kod odraslih se dokazuje u znatno manjem procentu, odnosno samo osetljivijim PCR metodama (nested PCR ili real-time PCR), što je sigurno i posledica činjenice da je pri kolonizaciji u čovečijem organizmu prisutan veoma mali broj mikroorganizama.

Osim reaktivacije latentne infekcije nastale još u detinjstvu, moguće su i *de novo* infekcije pneumocistisom tj. infekcije novim genotipovima jer su utvrđene i geografske i sezonske varijacije genotipova. Utvrđeno je da rezervoari *P. jirovecii* mogu da budu vazduh (nađen u sobama obolelih – u 80% uzoraka na rastojanju 1m od pacijanta, bolničkim hodnicima, u spoljašnjoj sredini), voda (ribnjaka idr.), zemljište, ali i čovek (4).

Utvrđena je i mogućnost direktnog prenosa *P. jirovecii* sa obolelog i/ili kolonizovanog na drugu osobu. U tom slučaju treba razmatrati klinički značaj izolacije obolelog i nastanak intrahospitalne pneumocistoze.

EPIDEMIOLOGIJA PCP

Pre epidemije AIDS-a ova oportunistička infekcija je retko opisivana, uglavnom kod prematurusa i novorođenčadi, odnosno pothranjenih odojčadi, kao sindrom intersticijalne limfoplazmacelularne pneumonije.

Epidemijska pojava PCP vezana je za pojavu epidemije HIV infekcije i 80- tih godina prošlog veka PCP je jedan od najznačajnijih uzročnika morbiditeta i mortaliteta osoba sa AIDS-om. Ovo posebno važi za razvijene zemlje, a s obzirom na teškoće u dijagnostikovanju i potrebu primene modernih tehnologija u dijagnostikovanju ove infekcije.

Uvođenjem profilakse trimetoprim-suflametaksazolom, a zatim i visoko aktivne antiretrovirusne terapije (HAART) 1995. u svetu, incidencija PCP u svetu je značajno smanjena. Takođe je utvrđeno da je kod HIV+ pacijenata koji imaju imunološki odgovor na HAART (CD4+ T Ly >350 ć/mm³) bezbedno prekinuti sekundarnu profilaksu PCP (5). U Srbiji je HAART takođe uveden kasnih 90-tih i time značajno smanjena učestalost ove infekcije.

Ipak, i pored promene epidemiološke situacije kad je u pitanju HIV infekcija, pneumocistoza je i dalje jedna od glavnih indikativnih bolesti vezanih za AIDS. U ovoj populaciji PCP je često udružen sa pneumonijama druge etiologije, pre svega tuberkulozom, što otežava kliničku dijagnozu i komplikuje lečenje. Osim toga, danas se PCP vezuje i za IRIS – immuno reconstitution inflammatory syndrome (inflamatorni sindrom vezan za obnavljanje imunskog odgovora) koji se javlja kod jedne grupe osoba sa AIDS-om koji su na HAART-u. Tokom IRIS-a dolazi do pogoršanja prethodnog stanja sa ponovnom pojavom oportunističkih infekcija, pa i PCP, kao posledica brze i neadekvatno regulisane restitucije imunskog odgovora u okviru tzv. nemaskiranih ili klinički tihih infekcija (6).

KLINIČKO ISPOLJAVANJE PNEUMOCISTOZE

Pneumocistoza je uglavnom lokalizovana u plućima. Intaktan imunski sistem dobro kontroliše pojavu infekcije, a pojava simptoma i znakova infekcije vezana je za pojavu imunosupresije usled urođenih ili stečenih imunodeficijencija. Epidemiološke karakteristike i kliničko ispoljavanje *P. jirovecii* pneumonije se značajno razlikuje zavisno da li je imunodeficijencija izazvana HIV infekcijom ili se radi o osobama koje su sa hematološkim malignitetima, transplantiranim osobama ili na hroničnoj terapiji kortikosteroidima, tokom npr. autoimunih oboljenja, ili drugoj imunosupresivnoj terapiji. Prelazak latentne u manifestnu PCP uobičajeno

se javlja u podmakloj imunosupresiji i to pri smanjenju CD4+ T limfocita ispod 200ć/mm^3 .

Početak bolesti kod HIV+ osoba je podmakao sa groznicom, otežanim i ubrzanim disanjem, cijanozom i subakutnim napadima neproaktivnog kašlja, a retko pojavom purulentnog ispljuvka. Sa razvojem bolesti javlja se i malaksalost, anoreksija, noćno znojenje i gubitak u težini, umerena ili visoka febrilnost koja traje više nedelja, a dispneja je sve izraženija. Mortalitet kod PCP je smanjen poslednjih godina (sa 17 na 10%), ali kod kritično bolesnih sa AIDS-om i dalje veoma visok (29-62%) (4,6).

Klinička slika PCP kod HIV negativnih imunosuprimiranih osoba ima akutniji i ozbiljniji tok u odnosu na PCP kod HIV+. Izažena je i hipoksemija i zapaljenski odgovor sa bogatijim BAL-om u kome se nalazi veći broj polimorfonuklearnih leukocita. Takođe je i broj *P. jirovecii* u BAL-u i drugim uzorcima značajno veći nego kod HIV+ osoba. Smrtnost od PCP kod osoba koje nisu inficirane HIV-om veća nego kod HIV+ sa PCP i kreće se i do 53% (4).

Radiografski PCP se tipično karakteriše difuznim bilateralnim intersticijalnim retikularnim ili granularnim infiltratima parahilarno i smanjenom prozračnošću pluća intenziteta mlečnog stakla (ground glass) što se javlja zbog eksudativnog alveolitisa (2,4). Ređe, mogu da se vide i fokalna konsolidacija, unilateralni infiltrati, intratorakalna adenopatija i pleuralna efuzija (2).

Ekstrapulmonalne manifestacije pneumocistoze uglavnom se javljaju kod osoba sa teškim imunodeficijencijama i to sa zahvatanjem limfnih čvorova, slezine, kostne srži, gastrointestinalnog trakta, očiju, tireoidne žlezde, nadbubrega i bubrega (1,2).

LABORATORIJSKA DIJAGNOZA PCP

U dijagnostici PCP značajni su, osim kliničke slike i radiološkog nalaza, povišen nivo serumske LDH i snižen PaO₂, kao i smanjena saturacija kiseonikom (1,2). Međutim, definitivna dijagnoza *Pneumocystis* penumonije postavlja se tradicionalnim mikološkim i molekularnim metodama.

Tradicionalne metode podrazumevaju mikroskopski pregled i detekciju *P. jirovecii* u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) dobijenog bronhoskopijom, plućnom tkivu dobijenom tranbronhijalnom ili transkutanom biopsijom pluća, kao i u indukovanom sputumu, dok pregled sputuma retko daje pozitivne rezultate. Mikroskopski pregled BAL-a pokazuje senzitivnost od 90-100%, dok je indukovani sputum koristan u slučaju prisutnog velikog broja parazita, ali daje i 20-25% lažno negativnih nalaza (1,2). Koriste se različite tehnike bojenja direktnih preparata, od kojih Gomori methenamin silver (GMS), toluidine blue i calcofluor white bojenjem boji zid oktetne ciste, dok Giemsa i PAS metoda boje elementarna tela unutar cisti i trofozoite (1,2,7). Direktnom imunofluorescentnom tehnikom uz korišćenje monoklonskih antitela boje se trofozoiti i zid ciste (7) i samo materijalna ograničenja i problemi u nabavci ograničavaju široku primenu ove veoma osetljive i specifične metode.

Međutim, i bronhoskopija i biopsija pluća spadaju u invazivne dijagnostičke metode koje se teško i nerado primenjuju, posebno kod HIV+ osoba, ali i osoba sa teškim opštim stanjem sa trombocitopenijama i koagulopatijama. Zbog navedenog, kao i zbog visoke senzitivnosti i specifičnosti metoda molekularne biologije, danas se one sve češće koriste, a pre svega Polymerase chain reaction (PCR). Koriste se različiti target geni i prajmeri (mitohondrijalna velika subjedinica rRNA-mtLSU, MSG geni idr), različite tehnike PCR (klasičan, nested PCR, real-time PCR) i različiti klinički uzorci (BAL, sputum, serum, ispirak ili bris usne duplje, nosa idr.) (8,9,10,11). Postoji mogućnost da se detekcijom određenih gena, kao i primenom kvantitativnog PCR (real-time PCR) utvrdi da li se radi o kolonizaciji ili infekciji (11,12). Kolonizacija pneumocistisom se danas uglavnom dokazuje visoko osetljivim PCR metodama (nested PCR ili real-time PCR) u uzorcima aspirata usne duplje ili nosa (4). Ipak, PCR je još uvek više istraživačka nego dijagnostička metoda u većini laboratorija.

Novi pristupi u dijagnostici PCP su dokazivanje beta glukana (1-3- β -D glukan) u BAL-u i serumu (kao pan-fungal Ag) i dokazivanje S-adenozilmetionina (AdoMet). Za razliku od beta glukana koji se nalazi u ćelijskom zidu gljiva, pa i pneumocistisa, S-adenozilmetionin je metabolit koji je neophodan pneumocistisu i koristi ga iz krvi čoveka, pa snižene koncentracije AdoMet-a u plazmi mogu da govore u prilog PCP. Ove metode su još uvek u fazi istraživanja.

LEČENJE I PREVENCIJA PCP

Antimikotici, pa ni ehinokandini se ne koriste u terapiji PCP. Lek izbora za lečenje, ali i profilaksu PCP je trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX, Bactrim^R), a efikasnost terapije zavisi pre svega od stepena i vrste imunosupresije i težine hipoksemije (1,2,4). Manje je toksičan od pentamidina, ali kod nekih pacijenata dovodi od alergije. Kod težih kliničkih formi PCP potrebno ga je dati u većim dozama i intravenski, bolje 21 nego 14 dana, i u kombinaciji sa kortikosteroidima. Toksičnost TMP-SMX se češće javlja kod HIV+ pacijenata.

Dokazano je prisustvo DHPS gena rezistencije na TMP-SMX, ali rezistencija nije značajnijih razmera. Kao alternativna terapija koriste se pentamidine, kombinacije trimethoprim - dapsone, clindamycin-primaquine, atovaquone - trimetrexate (1,2).

Cljučne reči: *Pneumocystis jirovecii*, biologija, patogeneza, dijagnoza, terapija

LITERATURA:

1. Cushion MT. Pneumocystis pneumonia u: Merz WG, Hay RJ (Eds.). Medical Mycology in Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections. Hodder Arnold ASM PRESS, 10th edition, 2005, 763-806.
2. Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD: Clinical mycology, Oxford University Press, 2003, 407-419.
3. Stringer JR et al. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for pneumocystis from humans. Emerg Infect Dis [serial online] 2002 Sep <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no9/02-0096.htm>
4. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. Clinical Microbiology Reviews 2012; 2: 297-317.
5. Ledergerber B. et al. Discontinuation of Secondary Prophylaxis against *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Patients with HIV Infection Who Have a Response to Antiretroviral Therapy N Engl J Med 2001; 344:168-174
6. Sharma SK, Soneja M. HIV & immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). The Indian Journal of Medical Research. 2011;134: 866-877.

7. Procop GW et al. Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol. 2004;42: 3333-3335.
8. Wakefield AE et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet 1990; 336: 451-453.
9. Flori P et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. Journal of Medical Microbiology 2004; 53: 603-607.
10. Linssen CFM et al. C. Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in bronchoalveolar lavage fluid samples. Journal of Medical Microbiology 2006; 55: 1229-1235.
11. Hauser PM et al. Multicenter, Prospective Clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* infection by use of a commercial real-time PCR assay. Journal of Clinical Microbiology 2011; 49: 1872-1878.
12. Botterel F et al. Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. Journal of Clinical Microbiology 2012; 50: 227-231.

IMUNODIJAGNOSTIKA HUMANE HIDATIDOZE**IMMUNODIAGNOSIS OF HUMAN HYDATIDOSIS**

Nataša Miladinović Tasić
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu
Institut za javno zdravlje Niš

Ehinokokoza/hidatidna bolest (HB) je zoonotska infekcija uzrokovana odraslom jedinkom ili larvom cestode iz roda *Echinococcus*. Uprkos primeni programa kontrole i nadzora ehinokokoze u mnogim zemljama sveta ova parazitoza još uvek predstavlja problem za javno zdravlje. Geografska distribucija HB je raznolika u svetu, kao i u Srbiji, a teritorija grada Niša je područje sa visokom seroincidencijom i seroprevalencijom ove parazitoze.

Značaj za javno zdravlje imaju morfološki i biološki različite vrste: *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*), *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* i *E. vogeli*. Danas su dostupne brojne metode molekularne biologije koje su omogućile identifikaciju i genotipizaciju sojeva *Echinococcus spp.* što još više doprinosi sagledavanju epidemiološke situacije/scenarija u određenoj oblasti.

Grupa eksperata za ehinokokozu dala je opšte smernice u dijagnostici ove parazitoze. Na raspolaganju su direktne i indirektna dijagnostičke metode što nameće neophodnost pravog odabira, odnosno, korišćenje najjednostavnije, najefikasnije i najjeftinije metode koja će najmanje biti štetna za pacijenta. Imaging metode su pogodne za skrining i otkrivanje novih slučajeva obolelih od ove parazitoze, dok su testovi za detekciju specifičnih antitela u serumu od posebnog značaja u serodijagnostici HB.

Metode za detekciju specifičnih antitela u serumu na antigene *Echinococcus spp.* omogućavaju dijagnozu ehinokokoze i/ili diferencijalnu dijagnozu u slučaju nekarakterističnih nalaza pri korišćenju imaging tehnika. Takođe, rezultati imunodijagnostičkih analiza omogućavaju i epidemiološko praćenje HB, a od velikog su značaja u prevenciji i kontroli ove parazitoze.

Za utvrđivanje ehinokoknih antitela u serumu suspektnih pacijenata na HB, preporučuje se primena primarnih i sekundarnih seroloških testova.

Korišćenjem više primarnih testova može se povećati osetljivost metode. Pozitivan serološki nalaz dobijen primenom primarnih testova treba potvrditi preciznijim, sekundarnim serološkim testom.

Ključne reči: hidatidna bolest, imunodijagnostika, javno zdravlje

VEKTORSKE ZARAZNE BOLESTI U SRBIJI

Čolović Čalovski I, Mitrović S, Džamić AM

Laboratorija za parazitologiju-mikologiju, Institut za mikrobiologiju i imunologiju,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, R Srbija

Medicinski značaj artropoda je višestruk: od toga da mogu da predstavljaju molestante, preko različitih reakcija na ubod artropoda u obliku alergijskog i toksičkog dejstva, do činjenice da su ekto- i endoparazite čoveka. Jedna od najvažnijih uloga artropoda je njihova vektorska uloga kao mehaničkih, a pre svega bioloških vektora različitih zaraznih bolesti (1).

Biološki fenomeni značajni za ekologiju oboljenja koje se prenose vektorima pre svega podrazumevaju vertikalnu i horizontalnu transmisiju. Vertikalna transmisija (vektor-vektor) može da bude transovarijumska gde dolazi do prenosa infektivnog agensa sa odrasle artropode na njeno potomstvo, u ovom slučaju artropoda je jedini ili zajedno sa drugim životinjama rezervoar infekcije u prirodi; ili transstadijumska gde se infektivni agens prenosi kroz sve stadijume razvoja artropode, ali ne i na potomstvo. Horizontalna transmisija sa vektora na vektora može da se ostvari kao seksualna transmisija ili kao prenos agensa sa jednog na drugog vektora koji se hrane na istom domaćinu (eng. *co-feeding transmission*). Horizontalna transmisija sa vektora na kičmenjaka, u smislu infekcije domaćina može pak da se ostvari na više načina: (a) salivom vektora (eng. *salivarian transmission*), (b) fecesom vektora (eng. *stercorarian transmission*), (c) regurgitacijom crevnog sadržaja vektora u ubodnu ranu, kao i (d) ingestijom vektora.

Prenos infektivnih agenasa može da bude aktivan, kada agens migrira kroz ubodnu ranicu u organizam domaćina, odnosno vektor direktno inokuliše agensa u krvotok domaćina ili pasivan je agens prisutan u ekskretu vektora pa čovek utrlja agensa u kožu tokom češanja. Agensi koji se prenose putem vektora pripadaju različitim grupama mikroorganizama, virusima, bakterijama, protozoama i helmintima.

Mogući razlozi povećane incidence i prevalence vektorskih infekcija poslednjih godina su različiti: sve bolja orijentisanost zdravstvenog

sistema uključujući i dijagnostičke metode, neodgovarajuća epidemiološka zaštita, veća izloženost vektorima (međunarodna trgovina, turizam, putovanja u endemske oblasti), ilegalna trgovina životinjama, migracije životinja (uključujući ptice) i povećanje populacije nezbrinutih životinja, promene u ponašanju ljudi, promene u snabdevanju vodom i irigacioni sistemi, rezistencija na insekticide, bihevioralne promene vektora i klimatske promene (2).

Bolesti koje prenose krpelji u Srbiji su mnogobrojne. Pored bakterijskih agenasa kao što su *Borrelia burgdorferi*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum* i *Ehrlichia* spp., krpelji su vektori i za viruse izazivače virusnog krpeljskog encefalitisa i Krimsko-Kongo hemoragične groznice, kao i protozoe koje pripadaju rodu *Babesia*. Kod nas je najznačajniji vektor tvrdi krpelj *Ixodes ricinus* koji je obligatni hematofagni ektoparazit gmizavaca, ptica i sisara, uključujući i čoveka. Jaja krpelji uvek polažu na tlu, dok razvojni oblici (larve i nimfe) i odrasli provode izvesno vreme na domaćinu sišući krv posle čega se otpuštaju i presvlače na tlu. U zavisnosti od toga da li krpelj tokom svog razvoja menja ili ne menja domaćina razlikuju se: (a) jednodomaćinski krpelji (monokseni), (b) dvodomaćinski krpelji (dikseni) i (c) trodomaćinski krpelji (trikseni), od čega ovi poslednji imaju najznačajniju ulogu u prenošenju pomenutih bolesti.

Lajmska bolest je najčešća vektorska bolest u Srbiji. U Izveštaju o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2013 godinu koji je objavio Institut za javno zdravlje "Dr Milan Jovanović Batut", samo u 2013 prijavljeno je 942 slučaja lajmske bolesti (3). Tako visoka stopa obolevanja korelira sa istraživanjem Milutinović i sar. Sa Instituta za medicinska istraživanja, koji su ispitivali prevalenciju *Borrelia burgdorferi* s.l. u *I. ricinus* na teritoriji Srbije, gde su utvrdili najvišu prevalenciju 53.7% na teritoriji Beograda, a najnižu 17.6% na teritoriji Vojvodine.

Kod krpelja u Srbiji je potvrđeno i prisustvo bakterije *Anaplasma phagocytophilum* i to sa najvišom prevalencijom u Vojvodini od 17.6%, dok je humana granulocitna anaplazmoza dijagnostikovana kao uzročnik infekcija kod nas (4).

Pored ostalih načina prenošenja tularemije, vektorska uloga krpelja u transmisiji ove bolesti je izuzetno značajna. Prisustvo *F. tularensis* u krpeljima *I. ricinus* je potvrđena kod 5.8% na području Beograda do 2.7% u centralnoj Srbiji. Za razliku od toga, epidemije tularemije su najčešće zabeležene na jugoistoku naše zemlje, gde je od ukupno 317 slučajeva registrovanih od 2000-2010 godine 70.3% slučajeva registrovano upravo na tom području sa pikom oboljevanja u avgustu i septembru (3).

U našoj zemlji je izazivač Krimsko-Kongo hemoragične groznice prvi put izolovan 1973 godine iz krpelja *H. marginatum* i *I. ricinus*. Infekcija se najčešće registruje na Kosovu i Metohiji. Tokom prolećno-letnjeg perioda 2001 godine na Kosovu je registrovana epidemija od 69 suspektnih slučajeva od kojih su 18 laboratorijski ili klinički potvrđeni, a šestoro osoba je umrlo.

U Srbiji se endemska područja visceralne lašmanioze (kala-azar) nalaze u južnoj i jugoistočnoj Srbiji, gde je dokazano i prisustvo vektora *Phlebotomus*. Najvažniji rezervoari infekcije u našoj zemlji su psi, šakali, pacovi i drugi glodari. Većina pacijenata je boravila u Crnoj Gori, ali se javljaju i autohtoni slučajevi.

Poslednjih godina se javljaju sporadični slučajevi infekcija vrstom *Bartonella quintana* kod nas, iako su istraživanja sprovedena u Rusiji i Francuskoj pokazala da je i do 15% vaški tela nađenih na beskućnicima inficirano ovom bakterijom.

Komarci (*Culicidae*) su vektori različitih infektivnih agenasa kod nas. Jedan od najznačajnijih je virus zapadnog Nila (West Nile Virus – WNV). Glavni rezervoari virusa u prirodi su ptice. Kod ptica infekcija najčešće protiče kao dugotrajna, asimptomatska viremija, čime je omogućeno zaražavanje komaraca koji su biološki vektori WN virusa. U Evropi virus prenose *Culex pipiens pipiens* i *C. molestus*. WNV je izolovan i iz vodozemaca, gmizavaca i sisara (glodari, kamile, goveda, konji, psi, čovek ...), ali se samo konji i lemuri, prema nekim autorima, smatraju značajnim rezervoarima virusa, s obzirom da kod njih infekcija protiče slično kao kod ptica. Ljudi su slučajni, neodgovarajući domaćini za virus, s obzirom da se kod njih ne razvija visoka, značajna viremija i ne učestvuju u ciklusu transmisije virusa. Predpostavlja se da je za nedavne

epidemije bolesti u Evropi odgovoran virus koji je unet iz Afrike preko ptica selica (filogenetska grupa I)(5).

Istraživanje rađeno 2005-2010 u Vojvodini pokazalo je prisustvo IgG antitela na WNV kod 4% (18/451) ispitivanih ljudskih seruma. Studija seroprevalencije koja je obuhvatila 3618 uzoraka seruma poreklom od čoveka i životinja (psi, konji) iz različitih regiona Srbije u periodu 2008-2012 pokazala je da virus cirkuliše u 9 od 18 ispitivanih oblasti. Rezultati nalaza specifičnih anti-WNV antitela kretali su se od 0.49% u Požarevcu do 6.45% u Novom Pazaru. U odnosu na poreklo uzoraka, najveća seroprevalencija je utvrđena kod konja od 3.97% (6,7).

Prva epidemija groznice Zapadnog Nila u Srbiji zabeležena je od avgusta do oktobra 2012 god. Većina pacijenata je bila poreklom iz Beograda i okoline (33), dok su ostali pacijenti bili iz Vojvodine (Srem, južni i severni Banat). Od 58 slučajeva, 45 su bili potvrđeni slučajevi infekcije, a 13 mogući slučajevi infekcije. Većina pacijenata u ovoj epidemiji je imala neuroinvazivni oblik bolesti, a devet osoba je umrlo. Svi pacijenti koji su umrli imali su encephalitis. Utvrđeno je da godine starosti, preko 60, i šećerna bolest predstavljaju rizik za nastanak encefalitisa. U 2013 god. u Srbiji je zabeleženo 260 slučajeva infekcije WNV.

Srbija je endemsko područje za dirofilariozu koju izaziva *Dirofilaria repens*, dok je vektor komarac *Culex pipens*. Najčešća klinička prezentacija ove bolesti je lokalizacija u različitim strukturama oka i subkutane manifestacije u obliku nodusa u kojima se nalazi parazit. Od 1971-2001 zabeleženo je 9 slučajeva dirofilarioze, dok je od 2001-2014 zabeleženo 28 slučajeva u Srbiji (8).

U Srbiji je malarija iskorenjena, ali se registruju importovani slučajevi kod naših ljudi koji su boravili u endemskim područjima. Na osnovu podataka Klinike za infektivne i tropske bolesti u Beogradu od 2001-2013 dijagnostikovano je 147 slučajeva importovane malarije (9). U oblasti Mediterana, odnosno u našoj zemlji postoji više vrsta vektora koji mogu da prenose uzročnike malarije, od kojih su najznačajniji komarci kompleksa *Anopheles maculipennis*. S obzirom da su u Grčkoj poslednjih godina zabeleženi slučajevi pojave autohtone malarije (68 slučajeva 2009-2012), neophodno je da se obrati posebna pažnja na ovu bolest kod nas.

Ključne reči: vektori, zarazne bolesti, Srbija

LITERATURA

1. L. Sedda, D.W. Morley, M.A.H. Braks, L. De Simone, D. Benz, D.J. Rogers. Risk assessment of vector-borne diseases for public health governance. *Public health* 2014; (128): 1049-1058.
2. Jolyon M Medlock, Steve A Leach. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infectious Diseases* 2015; March (23): [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70091-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70091-5).
3. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2013 godinu, Institut za javno zdravlje "Dr Milan Jovanović Batut"
4. Milutinović M, Radulović Ž, Tomanović S, Petrović Z. Krpelji (Acari: Ixodidae, Argasidae) Srbije. SANU, Bgd, 2012.
5. Lawrie CH, Uzcategui NY, Gould EA, Nuttall PA: Ixodid and argasid ticks and West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases* 2004 Apr; 10(4): 653-7.
6. N Popović, B Milošević, A Urošević, J Poluga, L Lavadinović, J Nedeljković, Dj Jevtović, O Dulović. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. www.eurosurveillance.org Article Id 20613.
7. T Petrović, A B Blázquez, D Lupulović, G Lazić, E Escribano-Romero, D Fabijan, M Kapetanov, S Lazić, J C Saiz. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. www.eurosurveillance.org Article Id 20622.
8. Džamić AM, Čolović IV, Arsić-Arsenijević VS, Stepanović S, Boričić I, Džamić Z, Mitrović SM, Rašić DM, Stefanović I, Latković Z, Kranjčić Zec IF. Human *Dirofilaria repens* infection in Serbia. *Journal of Helminthology* 2009, 83: 129-137.
9. Dakić Z, Kulišić Z, Stajković N, Pelemiš M, Čobeljić Mstanimirović Z, Indić N. Ecology of Anopheles mosquitoes in Belgrade area: Estimating vector potential for malaria retransmission. *Acta veterinaria* 2008; 58(5-6): 603-614.

GENETIČKI DIVERZITET TUMOROGENIH BAKTERIJA IZOLOVANIH IZ MALINE SA SIMPTOMIMA BAKTERIOZNOG RAKA U SRBIJI

Nemanja Kuzmanović¹, Anđelka Prokić¹, Milan Ivanović¹, Nevena Zlatković¹, Katarina Gašić², Aleksa Obradović¹

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija

Srbija je jedna od vodećih zemalja po proizvodnji i izvozu maline u svetu. U periodu 2011-2013. godine, utvrđena je intenzivna pojava bakterioznog raka korena i korenovog vrata maline u pojedinim mladim plantažama širom zemlje, praćena značajnim ekonomskim gubicima. Cilj ovog istraživanja bio je da se prouči genetički diverzitet tumorogenih bakterija izolovanih iz obolelih biljaka maline.

Izolacija bakterija vršena je iz tumora na korenu i korenovom vratu maline poreklom iz šest lokaliteta u Srbiji. Izolovani sojevi analizirani su primenom PCR metode sa prajmerima specifičnim za gene locirane na tumorogenom (Ti) plazmidu. Ukupno 14 PCR-pozitivnih sojeva odabrano je za dalji rad. Patogenost sojeva proverena je inokulacijom kriški mrkve, mladih biljaka paradajza i sejanaca suncokreta, dok su četiri reprezentativna soja korišćena za inokulaciju biljaka maline. Svi testirani sojevi indukovali su stvaranje tumora na inokulisanim biljkama. Iako je na osnovu dalje PCR analize utvrđeno da svi proučavani sojevi poseduju nopal-in-tip Ti plazmida, razdvojeni su u dve različite genetičke grupe na osnovu PCR-RFLP analize *virA-virB2* regiona Ti plazmida.

Na osnovu biohemijsko-fizioloških testova, PCR analize sa prajmerima specifičnim za sekvence 23S rRNK gena, kao i sekvencione analize 16S rRNK i *recA* gena, identifikovane su bar dve različite vrste. Od ukupno 14 sojeva, njih 12 je identifikovano kao *Rhizobium rhizogenes*, jedan soj pripadao je *Agrobacterium tumefaciens* genomskoj vrsti G8, dok se preostali soj grupisao unutar *A. tumefaciens* kompleksa, međutim bio je filogenetski različit od svih poznatih genomskih vrsta. Ukupno devet jedinstvenih ERIC-PCR profila utvrđeno je među proučavanim sojevima. Iako su sojevi *R. rhizogenes* ispoljili slične ERIC-PCR profile, bili su raspoređeni unutar 6 različitih genetičkih grupa.

Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje visokog stepena genetičkog diverziteta među tumorogenim bakterijama izolovanim iz obolelih biljaka maline u Srbiji. Predstavljeni podaci ističu značaj bakterioznog raka korena i korenovog vrata maline i doprinose taksonomskim proučavanjima roda *Agrobacterium*.

Istraživanja su obavljena u okviru projekta III46008 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, i EU projekta AREA, br. 316004.

Ključne reči: *Agrobacterium*, *Rhizobium*, bakteriozni rak korena i korenovog vrata, malina

BIOLOŠKI POTENCIJAL EKSTRAKATA MAKROMICETA IZ PRIRODNIH STANIŠTA

Anita Klaus¹, Maja Kozarski¹, Jovana Vunduk¹, Željko Žižak², Miomir Nikšić¹

¹Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju, Beograd, Srbija

²Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd, Srbija

Makromicete, gljive vidljive golim okom, široko su rasprostranjene u prirodi. Rastu na skoro svim geografskim širinama, a prisustvo određenih vrsta uslovljeno je nadmorskom visinom, količinom padavina, temperaturom, vlažnošću vazduha, sastavom zemljišta, mikroklimatskim uslovima, strukturama šuma, diverzitetom biljaka. Svi ovi faktori u velikoj meri utiču i na formiranje specifičnih bioloških svojstava gljiva.

Vekovima su, u različitim ljudskim zajednicama, gljive bile poznate kao izuzetno vredne namirnice, ali i kao lekovi pogodni za tretiranje niza poremećaja u organizmu, sredstva za održavanje dobrog zdravlja, poboljšanje kvaliteta i produžavanje života. Možda najstariji dokaz o korišćenju gljiva kao lekovitih sredstava predstavlja Eci, ledeni čovek, mumija stara oko 5300 godina, pronađena u Alpima, na 3210 mnv. Forenzika i savremene naučne metode utvrdile su da je bio ratnik, njegovo zdravstveno stanje, šta je jeo, ..., kao i da je sa sobom u torbi nosio dve vrste gljiva - *Fomes fomentarius* i *Piptoporus betulinus*. Obe ove gljive su nejestive jer su tvrde i drvenaste, ali imaju veoma izražena antioksidativna, antibiotska i prema nekim malignim ćelijskim linijama citotoksična svojstva; pored toga, inhibiraju angiotenzin I-konvertujućii enzim, pa time omogućavaju regulaciju povišenog krvnog pritiska. Neke od makromiceta su korišćene kao hrana i lekovi u tradicionalnoj ishrani naroda dalekog istoka, o čemu postoje pisani dokazi stari oko 4000 godina.

Gljive su oduvek bile cenjene zbog svojih nutritivnih i gastronomskih vrednosti, a danas se smatra da su vrlo pogodne za ishranu jer su siromašne kalorijama i mastima, a bogate proteinima, mineralima, dijetetskim vlaknima, vitaminima, fenolima. Zahvaljujući svom hemijskom sastavu sve više postaju atraktivna funkcionalna hrana, sa izraženim antibiotskim i antioksidativnim kapacitetom. Nutritivna

vrednost i svarljivost, kao i biološka svojstva gljiva mnogo zavise od vrste, uslova pod kojima je gljiva rasla, stadijuma zrelosti.

Makromicete iz prirodnih staništa, kao izvor visokovrednih polisaharida, posebno β -glukana, proteina, polifenola i terpenoida, danas postaju sve interesantnije zbog svojih izrazitih bioloških svojstava. Imajući ovo u vidu postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja a) određivanje antibakterijskog potencijala vrelog vodenog ekstrakta (VV), delimično prečišćenog vrelog vodenog ekstrakta (VP) i vrelog alkalnog ekstrakta (VA), dobijenih iz različitih makromiceta, prema selekcionisanim Gram-pozitivnim (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115) i Gram-negativnim (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 12900, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729) patogenim bakterijama prenosivih hranom; za određivanje antibakterijskog potencijala korišćene su sledeće metode: disk-difuzioni metod kao preliminarni skrining, mikrodilucioni metod za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC), makrodilucioni metod za određivanje kinetike inaktivacije bakterija u prisustvu ekstrakata makromiceta; b) procena antioksidativnog potencijala ovih ekstrakata koja je izvršena merenjem sposobnosti hvatanja DPPH slobodnih radikala, inhibicije lipidne peroksidacije, redukcione sposobnosti i sposobnosti heliranja jona gvožđa; c) utvrđivanje sposobnosti ekstrakata da inhibiraju angiotenzin I konvertujući enzim; d) određivanje citotoksičnog efekta na ćelijskim linijama malignog ljudskog karcinoma dojke MDA-MB-453, adenokarcinoma grlića materice HeLa i mijelogene leukemije K562. Antiproliferativna aktivnost ispitivanih ekstrakata određena je MTT testom.

Postoji čitav niz mikroorganizama koji može da izaziva različita oboljenja, kvari prehrambene, kozmetičke i farmaceutske proizvode, a čijom upotrebom može da dodje do intoksikacija. Uobičajen način borbe protiv mikroorganizama je upotreba odgovarajućih antibiotika, ali posle duže upotrebe antibiotika mikroorganizmi postaju na njih rezistentni, a pored toga javljaju se i mnogi neželjeni efekti, naročito pri dužoj i nepravilnoj upotrebi. Zato sve važnija postaju nova, prirodna,

antimikrobna sredstva, koja ne izazivaju neželjene efekte, kao što su makromicete i njihovi ekstrakti.

Disk difuzionim metodom potvrđeno je da su Gram-pozitivne bakterije osetljivije na prisustvo ispitivanih ekstrakata od Gram-negativnih bakterija. Prečnici zona inhibicije bili su u opsegu 6.2-26.0 mm. Najosetljivije su bile: *E. faecalis* u prisustvu VV (29 mm) i VP (26 mm) gljive *Auricularia auricula-judae*, *B. cereus* u prisustvu VA (27 mm) i VP (30 mm) gljive *Sparassis crispa* i VA (27 mm) gljive *Grifola frondosa*, a *L. monocytogens* u prisustvu VV (32 mm) i VA (28 mm) gljive *F. fomentarius*. Ovi ekstrakti su intenzivnije delovali na Gram-pozitivne bakterije od komercijalnih antibiotika gentamicina i tetraciklina, što ukazuje na njihov značajni antimikrobni potencijal.

Ovaj metod, kao preliminarni skrining antibakterijske aktivnosti, nije u potpunosti pouzdan jer prečnik zone inhibicije zavisi od mogućnosti difuzije antimikrobnih komponenata, tj., njihove hidrofobne ili hidrofilne prirode. S druge strane, neke komponente rastvorne u vodi mogu bolje da difunduju ali im je antimikrobna sposobnost niža. Zbog toga je primenjena mikrodiluciona metoda, kao brza kvantitativna tehnika za determinaciju minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), koja se definiše kao najniža testirana koncentracija uzorka koja omogućava kompletnu inhibiciju rasta bakterija. Ova metoda je pogodna jer se, kao rezultat metaboličke aktivnosti bakterija, javljaju precizno definisane krajnje tačke, koje ukazuju na redukciju trifetil tetrazolium hlorida (TTC) koji indikuje ćelijsku respiraciju. Ukoliko u ćeliji mikrotitarske ploče nije bilo promene boje taj uzorak je korišćen za utvrđivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBC), koja predstavlja najnižu testiranu koncentraciju uzorka koja ubija bakterijske ćelije. Najveći broj ispitivanih ekstrakata delovao je mikrobistatično na testirane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. MBC je postignuta samo u slučaju Gram-pozitivnih bakterija. Svi ispitivani ekstrakti delovali su na bakteriju *E. faecalis*, a najizraženija aktivnost je uočena kod VV (MIC-0.039 mg/ml; MBC-0.078 mg/ml) i VP (MIC-0.039 mg/ml; MBC-0.0156 mg/ml) gljive *A. auricula-judae*, kao i kod VA (MIC-0.0195 mg/ml; MBC-10 mg/ml) gljive *G. frondosa*. Najveći uticaj na bakteriju *S. aureus* imao je VA gljive *G. frondosa* (MIC-0.039 mg/ml; MBC-2.5 mg/ml), a na *B. cereus* VA gljive *S. crispa* (MIC-0.039 mg/ml; MBC-0.156 mg/ml), VP (0.039 mg/ml; MBC-0.078 mg/ml) i VA gljive *G. frondosa* (MIC-0.0195 mg/ml; MBC-

0.039 mg/ml). Najintenzivnije dejstvo na *L. monocytogenes* uočeno je u prisustvu VV (MIC-0.039 mg/ml; MBC-0.078 mg/ml) i VA (0.039 mg/ml; MBC-0.156 mg/ml) gljive *F. fomentarius*.

Jedan od mogućih razloga izraženije rezistencije Gram-negativnih bakterija je razlika u građi ćelijskog zida. Mnogo složeniji ćelijski zid Gram-negativnih bakterija ima ulogu difuzione barijere, čime omogućava i višu rezistenciju prema antimikrobnim supstancama.

Kako bi se stekla kompletna slika inhibitornog potencijala uzoraka primenjen je makrodilucionni metod, tj., kinetika inaktivacije. Kod ovog testiranja uzete su u obzir samo Gram-pozitivne bakterije, imajući u vidu rezultate dobijene disk difuzionim i mikrodilucionim metodom. Pri koncentraciji 1.25 mg/ml baktericidni potencijal su pokazale: prema *E. faecalis* VV (9 h) i VP (24 h) gljive *A. auricule-judae*, prema *B. cereus* VA (9 h) i VP (6 h) gljive *S. crispa* i VA (9 h) gljive *G. frondosa*, prema *L. monocytogenes* VV (3 h) VA (9 h) gljive *F. fomentarius*. Ovi rezultati su u skladu sa podacima dobijenim disk difuzionim i mikrodilucionim metodom, a ukazuju na važnu ulogu ekstrakata kao potencijalnih baktericidnih agenasa. Vrsta gljive, način pripreme ekstrakta i primenjena količina utiču, više ili manje, na različite vrste mikroorganizama mikrobistatično ili mikrobicidno.

Slobodni radikali koji su u velikim količinama prisutni u prehrambenim proizvodima mogu da oksidišu biomolekule što dovodi do smrti ćelija i oštećenja tkiva. Ovi procesi doprinose starenju, a pretpostavlja se i da su povezani sa degenerativnim bolestima kao što su poremećaji funkcija mozga, kancer, kardiovaskularne bolesti, katarakta, dijabetes i opadanje funkcija imunog sistema. Konstantna ishrana prirodnim proizvodima sa antioksidativnom aktivnošću, kao što su gljive, može da pomogne organizmu u redukciji oksidativnih oštećenja.

Antioksidativni potencijal ekstrakata praćen je pomoću nekoliko testova: sposobnost hvatanja DPPH radikala (merenje formiranja neradikalske forme DPPH-H u rastvoru, u prisustvu antioksidanta koji predaje svoj proton), redukciona sposobnost (merenje konverzije Fe^{3+} -fericijanid kompleksa u Fe^{2+} formu), inhibicija lipidne peroksidacije u model sistemu linoleinske kiseline (merenje formiranja konjugovanih diena u sistemu) i

helirajući efekat Fe^{2+} jona (Fe^{2+} se prati merenjem formiranja Fe^{2+} -ferozin kompleksa).

DPPH je slobodni radikal koji se često koristi za određivanje sposobnosti različitih uzoraka da hvataju slobodne radikale. Supstanca koja ima sposobnost da uhvati proton radikal reaguje sa slobodnim DPPH radikalom (tamno ljubičasta boja) i konvertuje ga u 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (neradikalna forma) uz obezbojavanje i snižavanje absorbance, što znači da antioksidativne sposobnosti gljiva potiču od sposobnosti predavanja protona. Medicinski važne gljive su inhibitori ili hvatači slobodnih radikala i imaju mogućnost da deluju kao primarni antioksidanti koji poseduju sposobnost da prekinu lančanu reakciju reagujući sa slobodnim radikalima koji su glavni propagatori autooksidacionog lanca masti. Sposobnost ispitivanih ekstrakata da hvataju slobodne DPPH radikale je doznno zavisna, tj., povećavala se sa porastom koncentracije. Pri koncentraciji 2.5 mg/ml VA gljiva *Ganoderma applanatum*, *F. fomentarius*, *G. frondosa* i *P. betulinus* hvatali su 96.3%, 96.4%, 84.6% i 64.4% slobodnih DPPH radikala, pojedinačno, a VP istih gljiva 83.4%, 80.5%, 57.5% i 54.2%. Najčešće su vreli alkalni ekstrakti bili bolji u ovom odgovoru, često sa boljim sposobnostima od standarda.

Inhibicija lipidne peroksidacije u model sistemu linoleinske kiseline meri formiranje konjugovanih diena u sistemu. Konjugovani dien se formira od ostataka dve dvostruke veze odvojene jednom metilenskom grupom, što je karakteristično za polinezasićene masne kiseline, a prati se spektrofotometrijski na 234 nm. Askorbinska kiselina ili drugi reduktori mogu da reaguju direktno sa peroksidima ili određenim prekursorima sprečavajući formiranje peroksida. Ovaj metod može da se koristi za ispitivanje ranih faza lipidne peroksidacije koja je i glavni uzrok pogoršanja kvaliteta hrane, a manifestuje se promenom boje, arome, teksture i nutritivne vrednosti. Oksidativna modifikacija lipoproteina niske gustine (LDLs) može da utiče na razvoj ateroskleroze. Sa povećanjem koncentracije ekstrakta povećava se i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije. Pri koncentraciji 0.05 mg/ml VV gljiva *P. betulinus*, *G. applanatum*, *F. fomentarius* pokazali su sposobnost prevencije peroksidacije linoleinske kiseline od 79.8%, 74.5% 72.2%, pojedinačno, a VA istih gljiva 50.5%, 78.9%, 80.55%. Vreli alkalni

ekstrakti su uglavnom imali izraženiju sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije, neki i od standarda.

Redukcija Fe^{3+} obično se koristi kao indikator sposobnosti doniranja elektrona. Rastvor menja boju iz žute u različite nijanse zelene i plave boje, u zavisnosti od redukcionih sposobnosti. Konverzija Fe^{3+} /fericijanid kompleksa u Fe^{2+} formu je uzrokovana doniranjem elektrona. Neke medicinski važne gljive imaju sposobnost predavanja elektrona. Redukciona sposobnost se povećava sa porastom koncentracije ekstrakta. Pri koncentraciji 2.5 mg/ml VA gljiva *G. applanatum*, *Agaricus silvaticus*, *G. frondosa* i *P. betulinus* imali su redukcionu sposobnost 1.830, 1.397, 1.132 i 1.119, pojedinačno, a VV istih gljiva 0.702, 0.842, 0.632 i 0.314. U većini slučajeva vreli alkalni ekstrakti imali su viši potencijal predavanja elektrona.

Sposobnost heliranja se bazira na činjenici da ferozin kvantitativno formira kompleks sa Fe^{2+} . U prisustvu helirajućih agenasa, kao što su ekstrakti gljiva, formiranje kompleksa se prekida, a intenzitet crvene boje se smanjuje. Promena boje ukazuje na sposobnost heliranja ekstrakta i hvatanje fero jona pre nego što to učini ferozin. Sa porastom koncentracije ekstrakta povećava se i sposobnost heliranja. Pri koncentraciji 2.5 mg/ml VV gljiva *G. applanatum*, *A. silvaticus*, *Hericium erinaceus* imali su sposobnost heliranja 91.1%, 86.1%, 57.3%, pojedinačno, a VA istih gljiva 49.7%, 59.7%, 50.3%. Kod većine ispitivanih ekstrakata vreli vodeni ekstrakti imali su značajno izraženiji potencijal formiranja kompleksa sa Fe^{2+} . Gvožđe može da stimuliše lipidnu peroksidaciju Fentonovom reakcijom i da ubrza peroksidaciju razlaganjem lipidnih peroksida na peroksil i alkoksil radikale koji zatim vezuju vodonik i nastavljaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Kako su fero joni najefektniji pro-oksidenti u hrani, visoka sposobnost ekstrakata gljiva da heliraju fero jone doprinosi kvalitetu hrane jer helatori gvožđa mobilizuju gvožđe iz tkiva i formiraju rastvorljive, stabilne komplekse koji se izlučuju iz organizma.

Ispitivani ekstrakti makromiceta sadrže mešavine/komplekse polisharida, proteina i polifenola, koji ostaju aktivni i posle primenjenih tretmana ekstrakcije, posebno alkalne, kao i etanolne precipitacije i dijalize. Vrlo intenzivan postupak alkalne ekstrakcije, tokom kojeg dolazi do degradacije, transformacije i formiranja novih molekula, koji doprinose

višoj aktivnosti alkalnog ekstrakta, omogućava i dobijanje ekstrakta sa izrazitim biološkim potencijalom. Polisaharidni ekstrakti testiranih makromiceta, kao prirodni antioksidanti, mogu da budu dobra osnova za razvoj antioksidativnih dodataka hrani.

Angiotenzin konvertujući enzim, ACE, utiče indirektno na povišenje krvnog pritiska time što, konverzijom angiotenzina I u angiotenzin II, izaziva skupljanje krvnih sudova. Zbog toga se i lekovi, poznati kao ACE inhibitori, koriste za snižavanje krvnog pritiska. Većina testiranih ekstrakata gljiva pokazala je visoku sposobnost inhibiranja ACE. Pri koncentraciji 4 mg/ml VA gljiva *F. fomentarius*, *S. crispa*, *P. betulinus* inhibirali su ACE sa 96.3%, 86.4%, 65.9%, a VV istih gljiva sa 96.3%, 72.8%, 65.8%. U najviše slučajeva vreli alkalni ekstrakti su imali najizraženiju ovu sposobnost, što je u korelaciji sa sadržajem proteinskih i polifenolnih komponenata u uzorku. Alkalni ekstrakt sadrži više fenolnih komponenata koje se oslobađaju tokom hidrolize glikozidnih veza polisaharida.

Hipertenzija je među vodećim uzročnicima smrtnosti ljudi u industrijalizovanim zemljama, u kojima je u ishrani većine ljudi dominantna prerađena hrana. S obzirom na to da antihipertenzivni lekovi imaju mnoge neželjene efekte, sve je važnije pronalaženje novih izvora medicinski važnih komponenata koje bi mogle da utiču na snižavanje krvnog pritiska, a koje ne bi uticale štetno na zdravlje.

Da bi se utvrdio citotoksični efekat praćena je antiproliferativna aktivnost ekstrakata gljiva, MTT testom. Testiranjem citotoksičnosti na ljudskim ćelijama adenokarcinoma grlića materice HeLa, malignim ćelijama tumora dojke MDA-MB-453 i ćelijama mijelogene leukemije K562, utvrđeno je da ekstrakti gljiva pokazuju najčešće srednju citotoksičnost, izraženo u IC_{50} vrednostima (koncentracija ekstrakta potrebna za 50% inhibicije, *in vitro*). Najizraženiji citotoksični efekat pokazao je VA gljive *F. fomentarius*, koji je imao $IC_{50}=0.564$ mg/ml za HeLa ćelije, $IC_{50}=0.879$ mg/ml za MDA-MB-453 ćelije i $IC_{50}=0.312$ mg/ml za K562 ćelije. Kao kontrolne korišćene su normalne ćelije fibroblasti pluća ljudskog fetusa MRC-5 i epitelijalne ćelije bronhija ljudskih pluća BEAS-2B. Pored ovih, kao kontrolne korišćene su i HTR-8/SVneo trofoblastne ćelije, čiji je rast čak bio stimulisan u prisustvu ekstrakta gljive *Ganoderma lucidum*.

Na osnovu svih dobijenih rezultata pokazalo se da su ekstrakti gljiva otporni na dejstvo visokih temperatura i da zadržavaju visok antimikrobni, antioksidativni, antihipertenzivni potencijal, kao i antitumorni potencijal *in vitro*, uprkos svim tretmanima primenjenim pri njihovom dobijanju.

Upotreba makromiceta iz prirodnih staništa i njihovih ekstrakata, kao dodataka hrani, mogla bi da smanji broj trovanja hranom izazvanih mikroorganizmima. S obzirom na to da neki sintetički antioksidansi, koji se intenzivno primenjuju u savremenoj proizvodnji hrane mogu da budu štetni po zdravlje, a neki čak imaju mutageni efekat, bilo bi vrlo korisno zameniti ih prirodnim sredstvima, kao što su gljive i njihovi ekstrakti, kako bi se obezbedila prevencija ili smanjenje oksidativnih oštećenja.

Korišćenje prirodnih komponenata izdvojenih iz makromiceta, kao i njihovih ekstrakata moglo bi da doprinese poboljšanju zdravlja savremenog čoveka.

TRICHODERMA IZOLOVANA IZ AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA KAO ANTAGONISTA BOTRYTIS CINEREA

Jelena Jovičić Petrović, Vera Raičević

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Apstrakt: Dodatak kompostiranog agroindustrijskog otpada u zemljište ima niz pozitivnih efekata po useve, između ostalih suzbijanje bolesti biljaka. Potvrđeno je da u supresivnom efektu koji poseduje kompost značajnu ulogu ima biotička komponenta. Cilj istraživanja je bio da se izvrši izolacija gljiva iz agroindustrijskog otpada i da se izvrši selekcija onih koji pokazuju antagonizam prema *Botrytis cinerea*. Odabrani antagonista – predstavnik roda *Trichoderma* je konvencionalnim i molekularnim metodama identifikovan do nivoa vrste. Cilj istraživanja bilo je i in vitro i in vivo ispitivanje uticaja ekstracelularnih metabolita odabranog izolata na *B. cinerea*.

Selekcija gljiva izvršena je putem konfrontacijskog testa. Odabrani antagonista iz roda *Trichoderma* identifikovan je na osnovu morfoloških karakteristika, kao i sekvenci ITS i TEF-1 α regiona. Za određivanje uticaja ekstracelularnih metabolita antagoniste na *B. cinerea* korišćen je filtrat tečne kulture izolata odgajanog na krompir dekstroznom bujonu. Određen je procenat inhibicije rasta micelije *B. cinerea* na podlozi kojoj su dodate različite koncentracije filtrata tečne kulture (10-100%). Sterilan 100%-ni filtrat tečne kulture korišćen je u in vivo ogledu kako bi se utvrdio efekat na suzbijanje pojave poleganja krastavca uzrokovanog patogenom *B. cinerea*.

Jedan od izolata koji je pokazao antagonizam prema *B. cinerea* u konfrontacijskom testu pripadao je rodu *Trichoderma* sp. Odabrani soj je doveo do inhibicije rasta od 68% uz pojavu zone inhibicije rasta, a na osnovu primenjenih metoda identifikovan je kao *T. longibrachiatum*. Filtrat tečne kulture *T. longibrachiatum* inhibirao je rast patogena do 61.3%, pri čemu je nakon autoklaviranja zadržao inhibitornu aktivnost. U in vivo ogledu, sterilan filtrat tečne kulture pokazao je efikasnost u suzbijanju poleganja krastavca uzrokovanog *B. cinerea* od 76% u slučaju primene slabijeg inokuluma patogena.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kompost od agroindustrijskog otpada u okviru diverziteta gljiva poseduje potencijal za suzbijanje *B. cinerea*. Filtrat tečne kulture *T. longibrachiatum* može poslužiti kao osnova za izolaciju novih antifungalnih jedinjenja.

Ključne reči: *Botrytis cinerea*, antagonizam, inhibicija rasta, *Trichoderma*

UVOD

Procenjuje se da u svetu na godišnjem nivou nastane oko 3,5 milijardi tona agroindustrijskog otpada [1]. Agroindustrijski otpad uglavnom predstavlja slabo iskorišćen resurs, a s obzirom na njegovu biorazgradivost može na jednostavan način biti preveden u vredne proizvode, kao što je kompost. Kompost može imati značajnu upotrebnu vrednost u održivoj poljoprivredi. Kompostirani agroindustrijski otpad koristi se kao organski dodatak u oplemenjivanju poljoprivrednog zemljišta, a korisni efekti ovakvog dodatka su višestruki.

Pored unosa organske materije, kompost koji se dodaje zemljištu deluje i kao inokulum korisnih mikroorganizama, koji stupaju u različite interakcije sa mikroorganizmima iz okruženja, a među njima je i antagonizam sa fitopatogenim gljivama. Efekat dodatka komposta zemljištu na smanjenje incidence bolesti biljaka čini da je ova mera prepoznata kao deo integralnog pristupa kontroli biljnih patogena [2,3]. Više od 80 godina poznato je da filamentozne vrste roda *Trichoderma* stupaju u antagonističke odnose sa različitim fitopatogenim gljivama [4] i danas su jedna od čestih komponenti komercijalnih biofungicida koji se koriste u kontroli ekonomski važnih biljnih patogena [5]. S obzirom da *Trichoderma* ima sposobnost preživljavanja u različitim ekološkim nišama, ova karakteristika, zajedno sa sposobnošću da ima brz rast i proizvodi visoko efikasne siderofore pomoću kojih helati gvožđa inhibiraju rast drugih gljiva čine *Trichoderma* snažnim konkurentom [6,7].

Botrytis cinerea predstavlja ekonomski značajnog biljnog patogena. Ukupni gubici prinosa u proizvodnji grožđa u svetu uzrokovani samo fitopatogenom *B. cinerea* procenjuju se na najmanje dve milijarde \$US na godišnjem nivou [8]. Zbog širokog kruga domaćina, ovaj patogen nanosi

velike štete i u proizvodnji drugih useva, kao što su malina, jagoda, povrće i ukrasne biljke, a sve češći problem predstavlja i u stakleničkoj proizvodnji. Pored toga, tretman fungicidima protiv *B. cinerea* je doveo do pojave rezistentnih sojeva, što ukazuje na potrebu za razvojem novih sredstava zaštite [9]. Jedna od alternativa je i biološka kontrola pomoću korisnih mikroorganizama koji ispoljavaju antagonizam prema ovoj fitopatogenu. Među antagonistima *B. cinerea* do sada su opisane brojne filamentozne gljive kao što su *Trichoderma* sp., *Ulocladium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. [10]. Među prvim komercijalizovanim preparatima na bazi *Trichoderma* sp. je preparat na bazi *T. harzianum* T39 [11].

Cilj istraživanja je bio da se ispita antagonizam *Trichoderma* sp., izolata 10/5 izolovanog iz komposta od agroindustrijskog otpada na *B. cinerea* u in vitro i in vivo uslovima.

MATERIJAL I METODE

Soj *B. cinerea* korišćen u istraživanju potiče iz kolekcije Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd. Izolat 10/5, antagonista *B. cinerea*, predstavnik roda *Trichoderma* dobijen je iz komposta od džibre (sporednog proizvoda iz proizvodnje šljivovice). Deo je kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju, Poljoprivredni fakultet, Zemun. U prethodnim istraživanjima je izolovan i selektovan putem konfrontacijskog testa kao antagonista biljnih patogena i identifikovan na osnovu morfoloških parametara kao *Trichoderma longibrachiatum* [12]. U ovim istraživanjima je prvi korak bio preciznija identifikacija soja na osnovu molekularnih karakteristika, s obzirom da se radi u predstavniku sekcije *Longibrachiatum* koju čine međusobno morfološki veoma slične vrste [13].

U cilju molekularne identifikacije izvršena je izolacija ukupne DNK izolata pomoću DNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Nemačka) prateći uputstva proizvođača. Zatim je izvršeno umnožavanje sekvenci ITS i TEF-1 α regiona. PCR reakcije izvedene su u termosajkleru Thermocycler T-1 (Biometra, UK) u radnoj zapremini od 25 μ l koju čine 12,5 μ l 2X PCR Master miksa (K071, Fermentas, Litvanija), 9 μ l RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), po 1,25 μ l svakog prajmera (100 pmol/ μ l, Metabion International, Nemačka) i 1

μl ekstrahovane ukupne DNK. Umnožavanje ITS regiona je izvršeno pomoću ITS1/ITS4 para prajmera [14], a TEF-1α regiona pomoću ef1/ef2 para prajmera [15]. Nakon elektroforetske vizuelizacije fragmenti su poslani na uslužno sekvencioniranje na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobljene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., određene su im konsenzus nukleotidne sekvence i deponovane su u GenBank bazu podataka u okviru National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Za određivanje uticaja ekstracelularnih metabolita antagoniste na *B. cinerea* korišćen je filtrat tečne kulture izolata odgajanog na KDA. Izolat je radi pripreme filtrata tečne kulture gajen u trajanju od dva dana i sedam dana na 25°C pri 160o/min u mraku. Filtrat tečne kulture je nakon odvajanja micelije sterilisan na dva načina: autoklaviranjem na 121°C u trajanju od 15 min i filtriranjem kroz membranske filtre promera 0,45μm (Milipore, Irska). Procenat inhibicije rasta micelije *B. cinerea* je određen poređenjem prečnika micelije na krompir dekstroznom agaru (KDA; Merck, Nemačka) kom su dodate različite koncentracije filtrata tečne kulture (10-100%) i prečnika fitopatogena na čistom KDA bez dodatka filtrata. Procenat inhibicije rasta je određen prema formuli: [(prečnik kolonija na podlozi sa filtratom - prečnik kolonija na kontrolnoj podlozi)/ prečnik kolonija na kontrolnoj podlozi] x 100.

Sterilan 100%-ni autoklavirani filtrat sedmodnevne tečne kulture *T. longibrachiatum* 10/5 pripremljen kao i u prethodnom ogledu, korišćen je u in vivo ogledu kako bi se utvrdio efekat na suzbijanje pojave poleganja krastavca uzrokovanog patogenom *B. cinerea*. Biljke su veštački inokulisane patogenom, a zatim je testiran uticaj filtrata tečne kulture na pojavu simptoma (tretman 10/5) i upoređivan sa pojavom simptoma na biljkama tretiranim standardnim fungicidom (F) i kontrolom (PK - inokulisane netretirane biljke). Ogled je izveden u uslovima staklenika. Priprema inokuluma biljnog patogena je vršena gajenjem sterilnom semenu pšenice [16]. Inokulacija biljaka krastavca je izvršena u fenofazi kotiledona sa dve količine inokuluma (po četiri, odnosno po tri zrna inokuluma oko korena svake biljke). Ispitivanje je ponavljano u pet ponavljanja sa po 10 biljaka u saksijama veličine 10cm x 15cm, napunjenih supstratom Florabalt Semi 1, Floragard®, Nemačka. Kao fungicid korišćen je fenheksamid (Teldor 500-SC, Bayer CropScience,

Nemačka). Negativnu kontrolu (NK) su predstavljale saksije sa neinokulisanim, netretiranim biljkama. Neposredno nakon inokulacije je vršeno tretiranje zalivanjem saksija sa po 100 ml ekstrakta *T. longibrachiatum* (10/5), odnosno zalivanje sa po 100 ml 0,1% razređenja fungicida (F) ili sa po 100 ml sterilne vode (PK, NK). Nakon inokulacije svakodnevno je praćena pojava poleganja biljaka, sve dok smrtnost u inokulisanoj netretiranoj kontroli nije dostigla oko 70%. Ogledi su postavljeni po potpunom slučajnom blok sistemu. Za obradu rezultata korišćene su standardne statističke metode, analiza varijanse i Duncan-ov test.

REZULTATI I DISKUSIJA

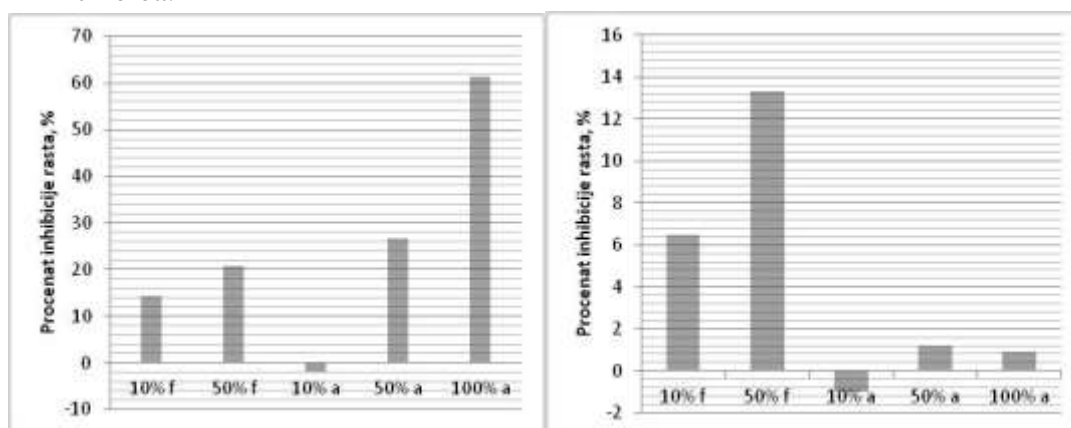
Prisustvo predstavnika roda *Trichoderma* sp. u kompostu od agroinsustrijskog otpada je očekivano s obzirom na prilagođenost različitim vrstama lignoceluloznog materijala [17]. Pored komposta, nalaze se u gotovo svim zemljištima, a neke su poznate po efektu suzbijanja prouzrokovaca bolesti biljaka i produkciji spektra hidrolitičkih enzima [18]. *Trichoderma* spp. se koristi u biološkoj kontroli bolesti izazvanih uzročnicima iz rodova *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Botrytis* i *Rhizoctonia* u mnogim usevima kao što su usevi zelene salate, jabuka, kukuruza šećerca, šargarepe, luka, grožđa, pasulja i drugih [19].

Prva faza istraživanja podrazumevala je preciznu molekularnu identifikaciju. BLAST analiza sekvence ITS produkta izolata 10/5 (GenBank pristupni br. KF267252), dužine 578 bp pokazala je da izolat 10/5 ima visok stepen nukleotidne indetičnosti (99-100%) sa izolatima koji pripadaju različitim vrstama *Trichoderma* sp. Sekvenca gena *TEF-1 α* pokazala se kao dovoljno informativna u molekularnoj identifikaciji. BLAST analiza dobijene sekvence (GenBank pristupni br. KF267251) pokazala je da izolat ima najviši stepen sličnosti (99-100%) sa 15 izolata vrste *T. longibrachiatum* koji potiču iz različitih životnih sredina. Jedan od izolata (EU401627) potiče iz rizosfere i opisan je kao antagonista *Fusarium sambucinum* [20].

Izolat 10/5 korišćen u istraživanju je u konfrontacijskom testu sa *B. cinerea* doveo do značajne inhibicije rasta fitopatogena i pojave zone inhibicije [12], ali mehanizmi ovog antagonizma nisu bili poznati. Među mehanizmima kontrole *Botrytis cinerea* od strane predstavnika

Trichoderma spp., veoma važnom smatra se upravo kompeticija s obzirom na osetljivost ovog patogena na manjak nutrijenata [21]. Međutim, ovaj mehanizam najčešće je sinergistički udružen sa produkcijom antibiotika i delovanjem hidrolitičkih enzima [22]. Stoga je naredni korak bio ispitivanje uticaja ekstracelularnih metabolita *T. longibrachiatum* 10/5 na *B. cinerea* u in vitro i in vivo uslovima.

U slučaju filtrata sedmodnevne kulture, rast *B. cinerea* bio je u najvećoj meri inhibiran u slučaju koncentracije 100% 10/5a filtrata, procenat inhibicije iznosio je 61,3%. (Grafikon 1). U slučaju 10%-nog filtrata inhibicioni efekat je izostao nakon sterilizacije, ali je 50%-ni filtrat zadržao svoju inhibitornu aktivnost i nakon termičkog tretmana. Rezultati ukazuju na produkciju termostabilnih ekstracelularnih metabolita *T. longibrachiatum* 10/5 sa inhibitorskim delovanjem na *B. cinerea*. Takođe je primećeno da je prisustvo autoklaviranih filtrata sedmodnevne kulture pri koncentracijama višim od 10% uticali na smanjenje gustine micelije *B. cinerea*.



Grafikon 1. Procenat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* 10/5 (a - sedmodnevna kultura; b - dvodnevna kultura). Levo: filtrat sedmodnevne tečne kulture; desno: filtrate dvodnevne tečne kulture.

Rezultati ogleda sa dvodnevnom kulturom ukazuju na to da u trajanju od 48h časova ne dolazi do stvaranja termostabilnih antifungalnih jedinjenja koja su imala udela u inhibiciji *B. cinerea* filtratom sedmodnevne kulture i da antifungalni efekat filtrata izostaje nakon termičkog tretmana.

Istraživanja Prapagdee i sar. [23] ukazuju na to da sekundarni metaboliti antagonista fitopatogenih gljiva nastali u stacionarnoj fazi rasta utiču na aktivnost autoklaviranih filtrata, dok filtrati dobijeni u eksponencijalnoj fazi rasta imaju aktivnost, ali je ne zadržavaju nakon termičkog tretmana ili tretmana proteinazom K. Autori pripisuju ovakav efekat prisustvu termostabilnih komponenata koje nastaju u stacionarnoj fazi rasta, dok su za delovanje filtrata eksponencijalne faze zaduženi metaboliti proteinske prirode – hidrolitički enzimi. Enzimi *Trichoderma* spp. navode se kao značajan mehanizam u suzbijanju *B. cinerea*. Pri tom proteaze imaju poseban značaj jer imaju dvostruko delovanje – utiču na klijanje spora i degradiraju enzime patogena zadužene za nekrozu tkiva [24].

Sterilan filtrat tečne kulture *T. longibrachiatum* 10/5 nije pokazao značajnu efikasnost in vivo u suzbijanju poleganja krastavca uzrokovanog *B. cinerea* ukoliko je primenjena veća količina inokuluma patogena (Tabela1). Nasuprot, kod primene manje količine inokuluma, efikasnost filtrata je bila značajna i iznosila je 76%.

Tabela 1. Intenzitet oboljenja i efikasnost sterilnog filtrata *Trichoderma longibrachiatum* izolata 10/5 na *Botrytis cinerea*

Tretmani	Ogled sa većom količinom inokuluma			Ogled sa manjom količinom inokuluma		
	Ms.	Sd	Efikasnost (%)	Ms.	Sd	Efikasnost (%)
Negativna kontrola (NK)	0,0 ^a	0,0	100	0,0 ^a	0,0	100
Pozitivna kontrola (PK)	7,8 ^c	0,4	22	6,6 ^b	2,1	34
Fenheksamid (F)	5,8 ^b	1,6	42	0,4 ^a	0,5	96
Filtrat (10/5)	6,6 ^{bc}	1,1	34	2,4 ^c	1,0	76

Intenzitet zaraze biljaka pri primeni filtrata pri manjoj količini inokuluma se statistički značajno razlikovala od intenziteta zaraze biljaka kod netretiranih inokulisanih biljaka (PK) gde je iznosio 76%, ali i od tretmana fenheksamidom (F) i negativne kontrole (NK). Elmer i Reglinski [10] navode da se najbolji rezultati u primeni biološke kontrole pomoću *Trichoderma* sp. u suzbijanju bolesti izazvane *B. cinerea* postižu kada je niska ili umerena incidenca bolesti, što je u skladu sa dobijenim rezultatima u okviru ovog istraživanja.

Rezultati in vivo ogleda ukazuju na potencijal metabolita *T. longibrachiatum* za primenu u suzbijanju bolesti izazvane *B. cinerea* u

stakleničkoj proizvodnji. Iako je većina do sada razvijenih komercijalnih biopreparata sa *Trichoderma* sp. kao aktivnim agensom (npr. Trichodex 20P, Makhteshim Ltd., Izrael) namenjena suzbijanju *B. cinerea* u vinogradima, daju uspehe u suzbijanju ovog uzročnika bolesti različitih biljaka u uslovima stakleničke proizvodnje, gde je ovaj patogen takođe čest uzročnik problema [25].

ZAKLJUČAK

T. longibrachiatum 10/5 izolovana iz komposta iz agroindustrijskog otpada proizvodi ekstracelularne metabolite koji imaju potencijal u suzbijanju *B. cinerea*. Mehanizam ove interakcije je kompleksan i uključuje delovanje termostabilnih i termolabilnih metabolita čiji udeli zavise od starosti kulture antagoniste. U in vivo uslovima, filtrat tečne kulture *T. longibrachiatum* 10/5 ispoljava značajnu efikasnost u slučaju manje količine inokuluma patogena.

Zahvalnica

Predstavljena istraživanja podržana su od strane projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod brojem TR31080, kao i projekta finansiranog od strane Evropske Unije AREA No. 316004.

LITERATURA

1. John, R. P., 2009. Biotechnological potentials of cassava bagasse, In: Biotechnology of agro-industrial residues (Singh nee' Nigam, P., Padney, A., Eds.). Springer Science + Business Media B. V. pp.226-238.
2. Bailey, K. L., Lazarovits, G., 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research*, 72: 169-180.
3. Hoitink, H. A. J., 2004, Disease suppression with compost: history, principles and future. I International Conference: Soil and Compost Eco-biology, September, 15th-17th, León, Spain.
4. Weindling R., 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Journal of Phytopathology*, 22: 837-845
5. Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393.

6. Klein, D., Eveleigh, D., E., 1998. Ecology of Trichoderma, In: Trichoderma and Gliocladium (C. P. Kubicek, Harman, G. E., Eds.). Taylor and Francis, London, UK. pp. 57–74.
7. Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., Haas, H., 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3: 561–563.
8. Elmer, P. A. G., Michailides, T. J., 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops, In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y. B., Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. pp. 243–272.
9. Leroux P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., Chapeland, F., 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58: 876–888.
10. Elmer, P. A. G., Reglinski, T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55: 155–177.
11. Elad, Y., 2001. TRICHODEX: commercialization of *Trichoderma harzianum* T39 – a case study. In: *Agro Report, Biopesticides: Trends and Opportunities* (Jarvis P., Ed.). Richmond, UK: PJB Publications Ltd, pp. 45 – 50.
12. Jovicic-Petrovic, J., Raičević, V., Sivčev, B., Kiković, D., Kljujev., I., 2012. Fungal isolates from agroindustrial waste as potential biocontrol agents. „International Symposium on Current Trends in Plant Protection“, 28th September 2012, Belgrade, Serbia. Book of proceedings 321–324.
13. Bissett, J., 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62: 924–931.
14. Takamatsu, S., Kano, Y., 2001. PCR primers useful for sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience*, 42:135–139.
15. Geiser, D. M., Jimenz, Gasco, M. M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A., O'donnell, K., 2004. FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473–479.
16. Chellemi, D. O., Mitchell, D. J., Kannwischer-Mitchell, M. E., Rayside, P. A., 2000. *Pythium* spp. associated with bell pepper production in Florida. *Plant Disease*, 84:1271–1274.

17. Gershuny, G., 2011. Compost, Vermicompost and Compost Tea: Feeding the Soil on the Organic Farm. Northeast Organic Farming Association Interstate Council, USA
18. Kubicek, C. P., Harman, G. E. 1998. *Trichoderma and Gliocladium*, Volume I, Basic biology, taxonomy and genetics, Taylor & Francis Ltd., UK
19. Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C., 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
20. Ru, Z., Di, W., 2012. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. *African Journal of Biotechnology*, 11: 4180-4186.
21. Latorre, B. A., Lillo, C., Rioja, M. E., 2001. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 28: 61-66.
22. Howell, C. R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.
23. Prapagdee, B., Kuekulvong, C., Mongkolsuk, S., 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4:330-337.
24. Elad, Y., Kapat, A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177-189.
25. Paulitz, T. C., Bélanger, R. R., 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 103-133.

PROPOLIS I SMOLA OD DRVENASTIH BILJAKA IZ SRBIJE KAO IZVORI ANTIMIKROBNIH SUPSTANCI

Slaviša Stanković, Ivica Dimkić i Tanja Berić*

*Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd

CILJEVI - Ispitivanje antimikrobnog efekta propolisa i smola iz pupoljaka nekih drvenastih biljaka iz različitih regiona Srbije, kao i određivanje sinergističkog efekta fenolnih jedinjenja i antimikrobne aktivnosti pojedinačnih komponenti smola.

METODE - Početno ispitivanje antibakterijskog potencijala 106 uzoraka ekstrakata propolisa i smola prema odabranim sojevima je vršeno difuzionim metodama. Mikrodiluciona metoda je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne (MIC) i baktericidne koncentracije (MBC) propolisa i smola, standardnih fenolnih jedinjenja i njihovog potencijalnog sinergizma. TLC hromatografijom su razdvojene kompleksne smeše uzoraka izabranih propolisa i smola, dok je bioautografijom određena antimikrobna aktivnost razdvojenih komponenti.

REZULTATI - Najsnažniji antibakterijski efekat ispoljili su propolisi oranž tipa sa MIC vrednostima već od 0.1 mg/ml, na većinu testiranih sojeva, tj. oni koji su sadržali visoku koncentraciju pinocenbrina, hrizina i galangina. Takođe, koncentracija propolisa od 0.3 mg/ml, bila je i najniža MIC vrednost za većinu Gram-pozitivnih bakterija, kao i za *Aeromonas hydrophila*. Veoma niska MIC vrednost (0.05 mg/ml) detektovana je za određene smole sa crne topole i višnje, dok je uzorak U 19 poreklom sa bele topole pokazao značajnu aktivnost prema svim sojevima, sa MIC vrednostima od 0.2-1.5 mg/ml. Ispitivanjem fenolnog profila smola pupoljaka crne topole, pokazano je prisustvo apigenina, kvercetina, hrizina, pinocembrina, galangina, pinobanksina i kafeinske kiseline, dok su smole bele topole pokazale prisustvo fenolnih kiselina, galangina i pinobanksina. Čista fenolna jedinjenja su pokazala dobru antimikrobnu aktivnost, naročito na Gram-negativne bakterije, sa MIC vrednostima od 0.2-2.5 mg/ml. Takođe, utvrđeno je da sinergistički antibakterijski efekat ostvaruju galna kiselina, kvercetin i kafeinska kiselina na *Bacillus subtilis*; zatim galna, kafeinska, *p*-kumarinska kiselina i naringenin na

Enterococcus faecalis; kao i naringenin, galna i kafeinska kiselina na *Shigella flexneri*. Biautografijom su identifikovana jedinjenja iz sastava smola odgovorna za antibakterijsku aktivnost i potvrđen je jak antibakterijski efekat uzoraka sa bele i crne topole.

ZAKLJUČAK - Ustanovljena je direktna pozitivna korelacija između antibakterijske aktivnosti propolisa i sadržaja totalnih fenola i flavonoida. Smole iz pupoljaka višnje kao i crne i bele topole ispoljavale su znatno veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na druge smole, usled visokih koncentracija fenolnih jedinjenja. Zbog sveprisutnog problema rezistencije bakterija na antibiotike i rastućeg broja višestruko rezistentnih sojeva, korišćenje propolisa i smola kao alternativnih antibakterijskih agenasa može biti rešenje.

Ključne reči: propolis, smole topola tipa, antibakterijska aktivnost

PREŽIVLJAVANJE FEKALNIH INDIKATORA I PSEUDOMONAS AERUGINOSA U PRIRODNOJ MINERALNOJ VODI

Dragoljub Cvetković¹, Aleksandra Veličanski¹, Aleksandra Zurovac²

¹Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad

²Pokrajinski sekretariat za zdravstvo, socijalnu politiku i demografiju, Novi Sad

U Srbiji, kao i u svetu, sve više preovladava trend korišćenja flaširanih voda. Voda za piće i flaširane vode se mikrobiološki ispituju sa ciljem da se identifikuju mikroorganizmi, odnosno utvrdi njihov broj ili prisustvo, na osnovu čega se daje mišljenja o kvalitetu vode prema važećoj zakonskoj regulativi. Cilj ovog rada je bio da se ispituju promene broja ćelija koliformnih bakterija *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* i *Enterococcus faecalis*, kao i *Pseudomonas aeruginosa*, u prirodnoj mineralnoj vodi, koja je čuvana na dve različite temperature u periodu od 150 dana. Odabrani uzorak prirodne mineralne vode u originalnom pakovanju veštački je kontaminiran sojevima navedenih bakterija koji su izolovani iz voda za piće, koji kao takvi predstavljaju alohtonu bakterijsku populaciju voda. U uzorcima prirodne mineralne vode su tokom perioda čuvanja praćene i promene ukupnog broja heterotrofnih i oligotrofnih bakterija, korišćenjem hranljivih podloga različitih nutritivnih karakteristika - Podloga za ukupan broj („Plate Count Agar“) i nisko nutritivne R-2A. Broj *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa* u kontaminiranim uzorcima tokom čuvanja određen je membranskom filtracijom. *Pseudomonas aeruginosa* je u uzorcima veštački kontaminirane prirodne mineralne vode čuvanim u frižideru i sobnoj temperaturi pokazao najbolju održivost tokom perioda od 150 dana. Pod uslovom da su u prirodnoj mineralnoj vodi u originalnom pakovanju nakon punjenja prisutne koliformne bakterije, koliformne bakterije fekalnog porekla/*E. coli* ili *Pseudomonas aeruginosa* ispod granice detekcije, *Pseudomonas aeruginosa* bi usled najvećeg potencijala za razmnožavanje pojedinačno predstavljao najdominantnijeg kontaminanta.

Ključne reči: prirodna mineralna voda, indikatori fekalnog zagađenja, *Pseudomonas aeruginosa*

ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA SOJEVA RODA SALMONELLA IZOLOVANIH IZ ZEMLJIŠTA I SEDIMENTA U SRBIJI

Dragan Radnović, Dragana Čučak, Olivera Babić, Ivica Tamaš
Departman za Biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom
Sadu

Analizom izvora infekcija u poslednjih dvadesetak godina konstatovano je da za čoveka najveći rizik od salmoneloza predstavlja konzumiranje svežih namirnica. Salmonele do namirnica mogu dospeti prilikom pripreme hrane u kuhinji, prilikom transporta ili na samoj njivi. Glavni izvori salmonela na njivama mogu biti stajsko đubrivo i voda za navodnjavanje pri čemu na pojavu infekcija utiče i dužina preživljavanja ovih bakterija u površinskom sloju zemljišta. Cilj ovog rada je bio da se odredi učestalost salmonela u ispitivanim uzorcima zemljišta, dužina njihovog preživljavanja u izvornim uzorcima, testiranje njihove antibiotske osetljivosti kao i da se utvrdi stepen njihove srodnosti na osnovu molekularnih analiza 16S rRNK.

Tokom mikrobioloških analiza obrađeno je ukupno 1062 uzorka zemljišta i sedimenta. Detekcija *Salmonella* spp. izvršena je po standardnoj ISO metodi 6579:2002/A1:2007. U 68 odnosno u 6,4%, uzoraka detektovana i izolovana je bakterija roda *Salmonella*. U 16 uzoraka zemljišta salmonеле su se mogle izolovati i posle 8 meseci nakon uzorkovanja, dok su u 5 uzoraka preživele duže od godinu dana.

Ukupno 32 izolata salmonela testirano je u odnosu na dvadeset četiri antibiotika na Vitek® uređaju i disk difuzionom metodom. Svi izolati su pokazali osetljivost na većinu testiranih antibiotika. Međutim, najveći broj izolata je bio rezistentan u odnosu na testirane cefalosporine I i II generacije, amikacin i gentamicin. Prema tome, ispitivani izolati su bili znatno osetljiviji u odnosu na sojeve poreklom iz životinja testiranih u pet zemalja Evropske unije kako je navedene u poslednjem izveštaju EFSA-e (2015).

Za dvadeset izolata salmonela urađena je filogenetska analiza zasnovana na sekvenciranju gena 16S rRNK. Za dobijanje filogenetskog stabla

korišćen je neighbor joining metod pri čemu je prilikom analize uključeno par kliničkih izolata sa kompletno sekvencioniranim genomima i nekoliko srodnih izolata familije Enterobacteriaceae. Naši izolati su na osnovu molekularne sličnosti podeljeni u dve grupe. Jednu koja je pokazala veću sličnost sa kliničkim izolatima i drugu koja je filogenetski udaljenija.

EVOLUCIJA METANOTROFIJE KOD BEIJERINCKIACEAE BAZIRANA NA KOMPARATIVNOJ GENOMICI

Ivica Tamaš

Departman za Biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

Alfaproteobakterije porodice Beijerinckiaceae pored heterotrofa sadrže i visoko-specijalizovane predstavnike koji isključivo rastu na metanu/metanolu.

U ovom radu baziranom na komparativnoj genomici analizirana je evolutivna istorija heterotrofne vrste *Beijerinkia indica* i njenih bliskih srodnika fakultativnog metanotrofa *Methylocella silvestris* i obligatnog metanotrofa *Methylocapsa acidiphila*.

Detaljna filogenetska analiza bazirana na 29 gena koji su univerzalno prisutni u svim genomima ukazuje na monofiletsko poreklo ove grupe bakterija kao i na vertikalno nasleđe gena za metilotrofiju/metanotrofiju kod *M. silvestris* i *M. acidiphila*. Sa druge strane, kod *B. indica* utvrđen je horizontalni transfer velikog broja gena vezanih za transport i metabolizam ugljenih hidrata, proizvodnju i konzervaciju energije i regulaciju transkripcije.

Dobijeni rezultati ukazuju da je poslednji zajednički predak savremenih linija Beijerinckiaceae bio metanotrof, a da je *B. indica* usvojila organotrofiju kao novi način života preko intenzivnog horizontalnog transfera gena.

BIOKATALITIČKA PRIMENA BAKTERIJSKE 4-OKSALOKROTONAT TAUTOMERAZE

Lidija Đokić

Laboratorija za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

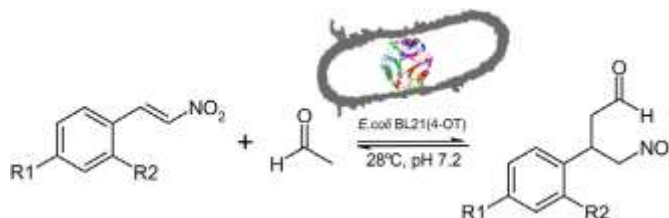
Biokataliza koja se u poslednjoj deceniji naglo razvila kao jedan od vidova zelenih procesa predstavlja primenu slobodnih enzima i mikroorganizmima u sintetičkoj hemiji (Bornscheuer et al., 2012; Drauz et al., 2012). To je praktična i ekološki prihvatljivija alternativa tradicionalnoj katalizi u hemijskoj sintezi. Biokatalizatori su napravljeni od obnovljivih izvora, biorazgradivi su, netoksični i najčešće visoko selektivni, što pojednostavljuje reakciju a dobija se i velika količina proizvoda. Biokatalitički procesi se odvijaju na sobnoj temperaturi, pri atmosferskom pritisku, u sredinama neutralnih pH vrednosti, što ih čini bezbednijim od hemijskih procesa (Buchholz et al., 2012).

Iako se biokataliza uglavnom oslanja na primenu prečišćenih enzima, primenom bakterijskih ćelija kao biokatalizatora dobijaju se jednako dobri ili čak i bolji prinosi proizvoda visoke optičke čistoće, konverzije su efikasnije, a sam process ekonomičniji. Bakterijske ćelije su izvanredni biokatalizatori i mogu se posmatrati kao male fabrike koje u sebi sadrže ne samo optimalnu količinu enzima, već i sve neophodne kofaktore. Korišćenje bakterijskih ćelija kao biokatalizatora je naročito efikasan pristup, jer se velika količina biokatalizatora dobija fermentacijom, čime se zaobilazi liziranje ćelija, centrifugiranje i prečišćavanje enzima.

Enzim 4-oksalokrotonat tautomeraza (4-OT) je kodiran xylH genom i deo je puta razgradnje aromatičnih jedinjenja kod *Pseudomonas putida* mt-2 (Harayama et al., 1989). Enzim 4-OT pored svoje prirodne aktivnosti prevođenja 2-hidroksiheksa-2,4-diendioat u 2-okso-3-heksendioat, katališe i reakciju Majklove adicije acetaldehida na β -nitrostiren (Zandvoort et al., 2012a), izomerizaciju cis-nitrostirena u trans-nitrostiren (Zandvoort et al., 2012b), kao i reakciju aldolne kondenzacije (Zandvoort et al., 2012c). Nitroaromatična jedinjenja u koja spada i β -nitrostiren zbog svojih antibakterijskih svojstava predstavljaju važnu grupu

jedinjenja, te su veoma interesantna kao prekursori u farmaceutskoj i hemijskoj industriji (Milhazes et al., 2006; Munoz et al., 2012).

U našoj laboratoriji napravljen je novi biokatalizator - bakterijske ćelije *Escherichia coli* BL21(DE3) u kojim je eksprimirana 4-OT (Narancic et al., 2013)(slika 1.). Na ovaj način bioproces je poboljšan 6 puta u odnosu na slobodan enzim, a enantioselektivnost procesa je bila veća od 99%. Da bi se dodatno povećala proizvodnja 4-nitro-3-fenil-butanala supstrat je dodavan sekvencijalno, a proizvod je prečišćavan iz reakcije. Međutim, biokatalizator je veoma brzo gubio aktivnost i posle tri ciklusa prinos proizvoda je bio samo 40%. Supstrat je dodavan u reakciju i bez prethodnog prečišćavanja proizvoda, ali je i ovako prinos proizvoda bio nizak i iznosio je oko 56%. Kako bi se poboljšala aktivnost i selektivnost enzima primenjen je proteinski inženjering. Dirigovanom mutagenезom, dobijene su dve varijante enzima eksprimiranih u *E. coli*, sa jednim i dva mutirana prolina na kraju enzima. Enzim sa jednom mutacijom je po aktivnosti bio sličan nativnom, dok je enzim sa dve mutacije imao veoma nisku aktivnost, najverovatnije zbog promene konformacije u okruženju katalitičkog centra što je dovelo do smanjene stabilnosti samog enzima.



Slika 1. Reakcija Majklove adicije acetaldehida na α -nitrostiren katalizovana *E. coli* BL21(DE3) ćelijama sa heterologo eksptimiranom 4-OT (Narancic et al., 2013).

Da bi se prevazišli ovi nedostaci i poboljšale biokatalitičke osobine *E. coli* 4-OT razvijena je efikasna metoda imobilizacije. Imobilizacija je najčešće korišćena metoda za poboljšanje veka trajanja biokatalizatora (Bickerstaff, 2000; Lalonde and Margolin, 2002; Pedersen and Christensen, 2000), i može biti postignuta adsorpcijom ili kovalentnim vezivanjem, kao i zarobljavanjem enzima ili celih ćelija u matriks (End and Schöning, 2004; Meyer and Birch, 1999; Tischer and Wedekind, 1999). Prednosti imobilisanog biokatalizatora su: veća temperaturna i pH

stabilnost, otpornost na supstate, višekratna upotreba i lako izdvajanje iz reakcione smeše. Takođe, jedan od ciljeva unapređenja je bilo i smanjivanje količine organskog rastvarača koji se koristi za prečišćavanje proizvoda, što je postignuto upotrebom XAD-2 jonoizmenjivačkih kuglica.

E. coli ćelije sa heterologo eksprimiranom 4-OT imobilisane su alginatom. Napravljenja su dva tipa kuglica, dijametra oko 1 mm i 2 mm, i kapsule sa tečnim centrom. Najbolje u pogledu rekcionog vremena, specifične aktivnosti i prinosa proizvoda bile su male kuglice, pokazujući 1.5 puta i 1.6 puta poboljšanje u rekcionom vremenu i prinosu u odnosu na slobodan biokatalizator. Primenom XAD-2 kuglica količina organskog rastvarača koja se koristi za prečišćavanje proizvoda smanjena je 40 puta u odnosu na prethodnu metodu korišćenu za slobodne ćelije.

Imobilisan biokatalizator po pitanju recikliranja je bolji od slobodnih ćelija, čime se izbegava prečišćavanje enzima i pojeftinjuje proces (Bornscheuer and Buchholz, 2005). Imobilisan biokatalizator *E. coli* 4-OT u alginatu pokazao je superiorne karakteristike u pogledu ponovnog korišćenja u odnosu na slobodne ćelije. Njegova relativna aktivnost je bila veoma visoka, oko 92% posle šest dana uzastopnog korišćenja i skladištenja preko noći na 4°C. Posle 60 dana korišćenja i skladištenja njegova relativna aktivnost bila je preko 85%, prinos proizvoda 80% (slika 2), a same kuglice su ostale intaktne i aktivne i nakon 90 dana.

Slika 2. Recikiranje imobilisanog biokatalizatora u reakciji adicije 10 mM acetaldehida na 1 mM α -nitrostiren. (A) Ciklus 4 (dan 1, \square); ciklus 7 (dan 2, \square); ciklus 10 (dan 3, \square); Ciklus 12 (dan 4, \square); Ciklus 24 (dan 60, \blacktriangle)(B) Fluorescentna mikrosopija poprečnog preseka imobilisanog biokatalizatora (kuglice) prvog dana i posle 60 dana skladištenja i korišćenja.

Katalitičke osobine biokatalizatora *E. coli* 4-OT kao što su višekratna upotreba, stabilnost na širem opsegu pH vrednosti i veći prinos reakcije (97.5%) poboljšane su imobilizacijom. Istovremeno imobilizacija je uticala na poboljšanje brzine reakcije, pojeftinjenje procesa, učinila ga ekološki prihvatljivijim i primenljivijim u industriji kao alternativa organskoj sintezi 4-nitro-3-fenil-butanala prekursora za sintezu amino alkohola.

LITERATURA

1. Bickerstaff, G., 2000. Immobilization of biocatalysts. 4 ed. Humana, New Jersey.
2. Bornscheuer, U., Buchholz, K., 2005. Highlights in biocatalysis - historical landmarks and current trends. *Eng. Life. Sci.*, 5, 309-323.
3. Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K., 2012. Engineering the thirdwave of biocatalysis. *Nature*, 485, 185.
4. Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.T., 2012. Biocatalysts and Enzyme Technology second edition ed. Wiley-VCH.
5. Drauz, K., Gröger, H., May, O., 2012. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis Wiley-VCH.
6. End, N., Schöning, K.-U., 2004. Immobilized Biocatalysts in Industrial Research and Production. Springer, Heidelberg.
8. Harayama, S., Rekik, M., Ngai, K.L., Ornston, L.N., 1989. Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-2,4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via meta cleavage in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*, 171, 6251-8.
9. Lalonde, J., Margolin, A., 2002. Immobilization of enzymes. 2 ed. Wiley-VCH, Weinheim.
10. Meyer, H.-P., Birch, J.R., 1999. Production with Bacteria and Mammalian Cells - Some Experience. *Chimia*, 53, 562-565.
11. Milhazes, N., Calheiros, R., Marques, M.P.M., Garrido, J., Cordeiro, M.N.D.S., Rodrigues, C., Quinteira, S., Novais, C., Peixe, L., Borges, F., 2006. b-Nitrostyrene derivatives as potential antibacterial agents: A structure-property-activity relationship study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 4078-4088.
12. Munoz, D.S., Hoyos, P., Hernaiz, M.J., Alcantara, A.R., Sanchez-Montero, J.M., 2012. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, 115, 196-207.
13. Narancic, T., Radivojevic, J., Jovanovic, P., Francuski, D., Bigovic, M., Maslak, V., Savic, V., Vasiljevic, B., O'Connor, K.E., Nikodinovic-Runic, J., 2013. Highly efficient Michael-type addition of acetaldehyde to b-nitrostyrenes by whole resting cells of

- Escherichia coli* expressing 4-oxalocrotonate tautomerase. *Bioresource Technology*, 142, 462-468.
14. Pedersen, S., Christensen, M., 2000. Immobilized biocatalysts. 2 ed. Academic, Amsterdam.
 15. Tischer, W., Wedekind, F., 1999. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. Springer, Heidelberg.
 16. Zandvoort, E., Geertsema, E.M., Baas, B.J., Quax, W.J., Poelarends, G.J., 2012a. Bridging between organocatalysis and biocatalysis: Asymmetric addition of acetaldehyde to ss-nitrostyrenes catalyzed by a promiscuous proline-based tautomerase. *Angewandte Chemie-International Edition*, 51, 1240-1243.
 17. Zandvoort, E., Geertsema, E.M., Baas, B.J., Quax, W.J., Poelarends, G.J., 2012b. An unexpected promiscuous activity of 4-oxalocrotonate tautomerase: The cis-trans isomerisation of nitrostyrene. *Chembiochem*, 13, 1869-1873.
 18. Zandvoort, E., Geertsema, E.M., Quax, W.J., Poelarends, G.J., 2012c. Enhancement of the promiscuous aldolase and dehydration activities of 4-oxalocrotonate tautomerase by protein engineering. *Chembiochem*, 13, 1274 – 1277.

EFEKTIVNOST FOTOKATALITIČKIH PREMAZA PREMA MIKROORGANIZMIMA

Ana Vidaković, Siniša Markov, Aleksandra Velićanski
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad, Srbija

Kontrola globalnog zagađenja životne sredine i ubrzana stopa rezistentnosti mikroorganizama prema širokom spektru antimikrobnih jedinjenja predstavljaju glavne probleme današnjice. Tokom poslednjih godina razvijaju se premazi na bazi fotokatalitičkog titanijum dioksida (TiO_2) čije se antimikrobne aktivnosti opsežno ispituju. U cilju povećanja antimikrobne aktivnosti fotokatalitički TiO_2 se često dopira jonima metala poput Ag(I) , Cu(II) i Zn(II) za koje je potvrđeno da ispoljavaju oligodinamičko dejstvo, odnosno, da u malim količinama imaju letalan efekat na mikroorganizme.

Metode ispitivanja antimikrobne efikasnosti fotokatalitičkih premaza su brojne, dok njihova primena zavisi od prirode supstrata na koji se premazi nanose. Za testiranje antimikrobne aktivnosti premaza nanetih na neporozne supstrate postoje adekvatne standardizovane metode poput JIS Z2801:2000 i ISO/DIS 13125, dok antimikrobna analiza poroznih supstrata sa fotokatalitičkim premazima nije standardizovana.

Prema literaturnim navodima antimikrobni efekat premaza na bazi TiO_2 potvrđen je na većem broju bakterija i kvasaca, uključujući: *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*. Nasuprot tome, spore plesni ispoljavaju rezistentnost prema fotokatalitičkim premazima, najverovatnije usled kompleksnije građe.

Zbog svoje netoksičnosti, dostupnosti, ekonomske isplativosti i potvrđenog fotokatalitičkog i antimikrobnog delovanja brojna naučna istraživanja ukazuju na potencijalnu primenu premaza na bazi TiO_2 u medicini, mikrobiološkim laboratorijama, industriji hrane i lekova, tretmanu otpadnih voda, kao i u inženjerstvu materijala i arhitekturi u

pogledu razvoja materijala sa funkcijom samočišćenja i antimikrobnim svojstvima.

S toga, ovaj rad daje pregled najznačajnijih tipova fotokatalitičkih premaza, mehanizam njihovog delovanja, metode testiranja antimikrobne aktivnosti, kao i oblasti primene novosintetisanih premaza.

Ključne reči: TiO_2 , antimikrobna aktivnost, metode testiranja

Zahvalnost: Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu su deo projekta III 45008 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije i projekta br 114-451-3426/2013-02 finansiranog od strane Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Autonomne Pokrajine Vojvodine, Republika Srbija.

OD AKCIDENTA DO KORIŠĆENJA POTENCIJALA BIOGEOCENOZA ZA REMEDIJACIJU

Jelena Milić¹, Mila Ilić¹

¹ Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju - Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu
Beograd, Srbija

OSVRT NA UTICAJ HEMIJSKIH ZAGADJIVAČA U ŽIVOTNOJ SREDINI

Proces industrijalizacije, kao posledica naučnih dostignuća i tehnološkog razvoja u mnogome je olakšao i unapredio uslove života u odnosu na period od pre dvesta godina. Ipak, ovaj proces je uveo i brojne hemikalije u životno okruženje koje sada čine deo našeg svakodnevnog života. Hemijska industrija je jedna od industrija sa najvišom stopom rasta na svetu i trenutno predstavlja 10% svetske ekonomije. Od drugog svetskog rata do danas upotreba hemikalija je drastično porasla, od milion tona godišnje do 500 miliona tona godišnje [1]. Smatra se da danas na tržištu postoji oko 100.000 hemikalija koje imaju komercijalnu vrednost i predviđa se da će globalna prodaja hemikalija do 2050. biti povećavana za oko tri odsto godišnje [2].

Uporedo sa razvojem i unapređivanjem industrije i proizvodnje došlo je i do povećanog generisanja otpada čija količina prevazilazi sposobnost prirode za samoprečišćavanjem. Posledica nagomilavanja otpada je narušavanje prirodne ravnoteže u biodiverzitetu, ugrožavanje održivog razvoja kao i štetan uticaj na ljudsko zdravlje i životnu sredinu.

BIOGEOCENOZE KAO IZVOR BIODIVERZITETA I NJIHOV POTENCIJAL ZA RAZGRADNJU POLUTANATA

Ekosistemi, odnosno biogeocenoze, su jedinstva životnog staništa (biotopa) i životne zajednice (biocenoze), u okviru kojih na specifičan način kruži materija i protiče energija. Faktori od kojih zavisi opstanak u nekom životnom području nazivaju se ekološki faktori (faktori spoljašnje sredine) i mogu biti: (1) abiotički oni koji predstavljaju nežive sile prirode (kao što su faktori klime, edafski faktori i orografski faktori), (2) biotički kao što su uzajamni odnosi i međusobna zavisnost među

samim živim organizmima i (3) antropogeni faktori (uticaj čoveka na prirodu).

Mikroorganizmi iz svih biogeosfera (pre svega bakterije i gljive, ali i alge i protozoe) poseduju prirodnu sposobnost razgradnje i transformacije zagađujućih supstanci (bioremedijacioni potencijal), zahvaljujući neslućenom diverzitetu njihovog metabolizma i genetičkoj promenljivosti.

Dejstvo biogeocenoza na ugljovodonične supstrate fosilnog porekla kao i proizvodi ovih interakcija koji su deo širih biogeotehnoških istraživanja skoro tri decenije, predmet su interesovanja i rada Grupe za mikrobiološku hemiju (GMBH), koju čine saradnici Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

MIKROORGANIZMI IZ ZAGADJENIH SREDINA KAO "BIOLOSKI AGENSI" ZA BIOREMEDIJACIJU NAFTE I NJENIH DERIVATA - NAŠA ISKUSTVA

Zagađenje životne sredine naftom i derivatima nafte posledica je ljudskog delovanja, odnosno posledica vađenja, transporta, prerade i korišćenja nafte. U toku ovih postupaka može doći do izlivanja štetnog sadržaja, i tehnologije uklanjanja i prečišćavanja zagađenih površina predstavljaju važnu kariku u protokolima za smanjenje izloženosti ljudi štetnim uticajima ovih zagađivača. Kada dođe do izlivanja u životnu sredinu, u ekosistemu je već prisutna mala populacija mikroorganizama, koja će razgraditi ovakve supstance. Kod nezagađenih zemljišta 1-10% prisutnih mikroorganizama koristi ugljovodonike kao izvor energije, a kod zagađenih zemljišta ovi mikroorganizmi mogu predstavljati većinski udeo u ukupnoj mikrobnoj populaciji [3]. Osim mikroorganizama koji primarno razlažu ugljovodonike, postoje i drugi mikroorganizmi koji za ishranu koriste komponente nastale primarnom razgradnjom. Ovakvo uklanjanje proizvoda razgradnje stimuliše dalju razgradnju polutanata.

Biološka degradacija i uklanjanje štetnih supstanci iz zemljišta, površinskih i podzemnih voda pomoću biogeocenoza predstavlja savremeni trend u sanaciji ovakvih zagađenja. Kao ispravan pristup problemu bioremedijacije zagađenih područja, nameće se potreba za izolovanjem mikroorganizama iz kontaminirane sredine, njihova

selekcija, ispitivanje efekata promene uslova sredine, kako fizičkog, tako i hemijskog tipa i optimizacija uslova u pogledu njihove efikasnosti i u pogledu razlaganja supstrata sa krajnjim ciljem definisanja postupka za njihovo ponovno vraćanje u kontaminiranu sredinu radi njenog izlečenja. Ovim biotehnološkim postupcima ubrzava se revitalizacija kontaminiranih terena na način koji potencijalno ima najmanje štetnih pratećih posledica [4].

Primer 1. – Mikrobna degradacija dizela D2 i PAH jedinjenja pomoću mikroorganizama izlovanih iz zagadjenog zemljišta

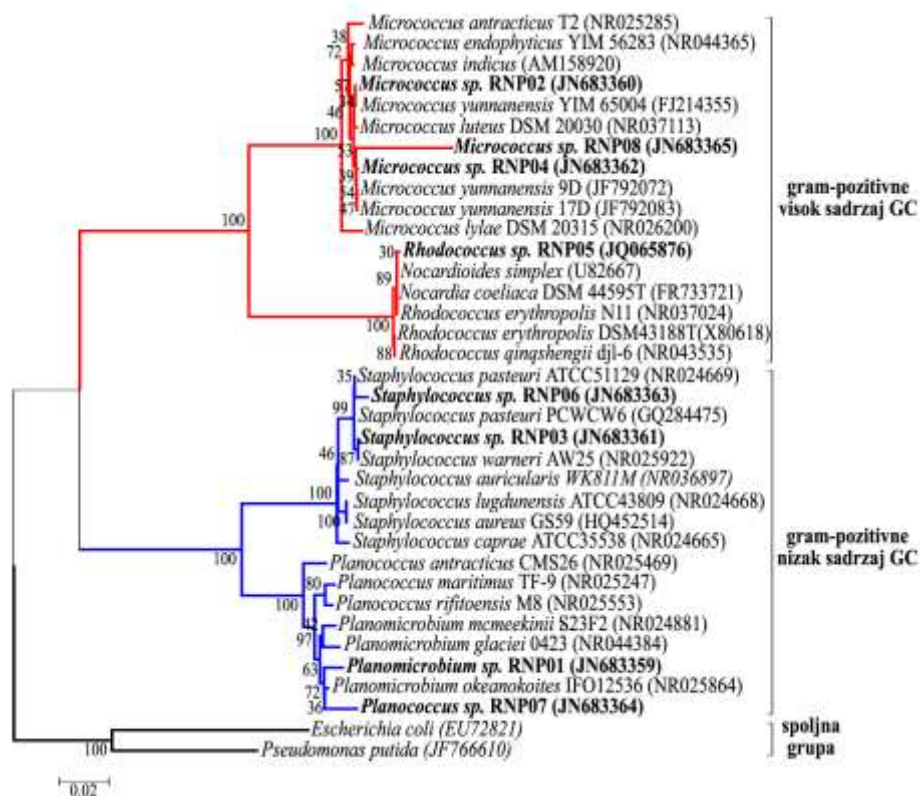
U cilju izolovanja i selekcije mikroorganizama sposobnih za degradaciju naftnih derivata iz okruza Rafinerije nafte Pančevo (RNP) uzorkovano je zagadjeno zemljište kao polazni ekosistem, odnosno potencijalno izvoriste mikroorganizama koji imaju sposobnost da razgradnje naftnih zagadjivača.

Iz opisanog uzorka zagadjenog zemljišta iz RNP izolovano je osam bakterijskih sojeva koji su sposobni da kao jedini izvor C atoma upotrebljavaju ugljovodonike dizel goriva D2. Morfološki različite kolonije su izolovane tehnikom zasejavanja najmanjeg razblaženja, a zatim trostruko presejane metodom iscrpljenja. Izolati su obogaćeni ("enrichment") na podlozi gde je jedini izvor ugljenika bio dizel D2, čime je i potvrđena njihova sposobnost za upotrebu ugljovodonika kao jedinog izvora C atoma.

Molekularnom analizom rRNA identifikovani su sledeći bakterijski sojevi: *Planomicrobium* sp. RNP01 (pristupni broj GENBank JN683359), *Micrococcus* sp. RNP02 (JN683360), *Staphylococcus* sp. RNP03 (JN683361), *Micrococcus* sp. RNP04 (JN683362), *Rhodococcus* sp. RNP05 (JQ065876), *Staphylococcus* sp. RNP06 (JN683363), *Planococcus* sp. RNP07 (JN683364), *Micrococcus* sp. RNP08 (JN683365).

Svi bakterijski izolati iz RNP su aerobne, nesporulišuće, gram-pozitivne, mezofilne bakterije koje ne rastu na niskim temperaturama (4° C). Dva izolata su pokazala rast na 42° C. Ovi sojevi nemaju sposobnost potpune redukcije nitrata do azota, odnosno većina njih može samo delimično da redukuje nitrat ili nitrit. Tri soja, RNP02, RNP03 i RNP08 nemaju

sposobnost ni delimične redukcije nitrata. RNP02 je jedini izolat koji može da proizvodi indol iz trptofana [5].



Slika 1. Filogenetsko stablo konstruisano pomoću sekvenci tipskih sojeva najbližnjih bakterijskim izolatima koji razgrađuju ugljovodonike iz RNP

Na osnovu sprovedenih testova za procenu bioremedijacionog potencijala (ćelijska respiracija pri rastu na različitim koncentracijama naftnih ugljovodonika, biodegradacioni potencijal izolovanih kultura bakterija pomoću brzih testova merenja optičke gustine) određena su dva bakterijska soja sa najvećim bioremedijacionim potencijalom i pomoću njih je izveden eksperiment biodegradacije dizel goriva D2 i odabranih PAH jedinjenja (Tabela 1.).

Tabela 1. Procena bioremedijacionog potencijala izolovanih bakterijskih sojeva

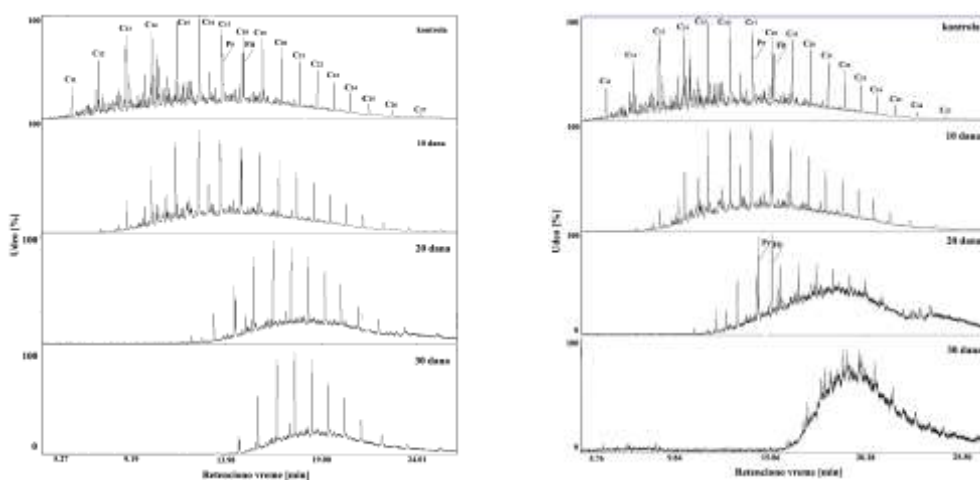
	Ćelijska respiracija; dehidrogenazna aktivnost merena pomoću TTC reagensa na podlozi sa 5% ugljovod. supstrata (A_{620nm})	Brzi test; Optička gustina merena u podlozi sa 5% ugljovodoničnog supstrata (A_{620nm})	2,6DCPIP kvalitativni test; promena boje 2,6 DCPIP reagensa na podlogama sa 6 različitih ugljovod. supstrata u koncentraciji od 5%*
<i>Planomicrobium sp.</i> RNP01	0,761	0,257	++++
<i>Micrococcus sp.</i> RNP02	0,587	0,214	Nema promene boje
<i>Staphylococcus sp.</i> RNP03	0,387	0,244	++
<i>Micrococcus sp.</i> RNP04	0,368	0,234	+
<i>Rhodococcus s.</i> RNP05	0,944	0,258	++++++
<i>Staphylococcus sp.</i> RNP06	0,393	0,211	+
<i>Planococcus sp.</i> RNP07	0,445	0,227	+++
<i>Micrococcus sp.</i> RNP08	0,368	0,240	++

* + označava broj podloga sa različitim ugljovodoničnim supstratima kod kojih je došlo do promene boje usled dejstva datog bakterijskog izolata

Bioremedijacioni potencijal sojeva *Planomicrobium sp.* RNP01 i *Rhodococcus sp.* RNP05 za remedijaciju lakših frakcija nafte je ispitan na dizelu D2 i smeši PAH jedinjenja u laboratorijskim uslovima. Sposobnost i efikasnost je procenjivana gravimetrijskom i gasnohromatografsko-masenospektrometrijskom (GC-MS) analizom dizela D2, koji je bio izložen datom bakterijskom soju.

Hromatogrami ukupne jonske struje TIC (eng. TIC - Total Ion Current) ugljovodoničnih frakcija izolovanih iz ekstrakta kontrolnog uzorka i uzoraka tokom eksperimenta biodegradacije nakon 10, 20 i 30 dana

prikazani su na Slici 2. Dominantna jedinjenja ugljovodoničnih frakcija kontrolnog uzorka su *n*-alkani i izoprenoidi pristan i fitan. Ove analize ukazuju na postepeno smanjenje *n*-alkana i izoprenoida tokom 30 dana. Nakon eksperimenta *n*-alkani i izoprenoidi nižeg broja C atoma, C₁₁-C₁₉ se ne mogu uočiti na TIC hromatogramu, što ukazuje na njihovu moguću potpunu degradaciju. U eksperimentu degradacije D2 pomoću *Rhodococcus* sp. RNP05 praktično dolazi do potpune biodegradacije, bazna linija je deformisana i nemoguće je detektovati pikove u TIC hromatogramu.

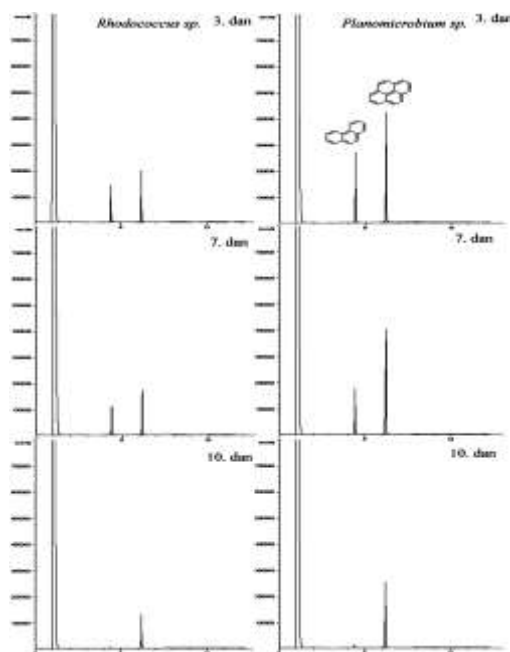


Slika 2: TIC hromatogrami ugljovodoničnih frakcija izolovanih iz ekstrakta kontrolnog uzorka i uzoraka tokom eksperimenta biodegradacije dejstvom *Planomicrobium* sp. RNP01(levo) i *Rhodococcus* sp. RNP05 (desno) nakon 10, 20 i 30 (Pr – pristan, Fit – fitan)

Dobijeni rezultati pokazuju da brzina biodegradacije TPH najveća u prvih deset dana kada je razgrađeno oko polovine ukupne TPH, nakon čega se biodegradacija usporava. Nakon 30 dana, od početka eksperimenta, *n*-alkani i izoprenoidi nižeg broja C atoma, C₁₁-C₁₉ se ne mogu uočiti na TIC hromatogramu, što ukazuje na njihovu moguću potpunu degradaciju. *n*-alkani su najpodložniji mikrobiološkoj razgradnji, pa je očekivano da prvo dođe do smanjenja sadržaja ovih jedinjenja. Na kraju eksperimenta, u TIC hromatogramu su dominirali *n*-alkani i izoprenoidi sa većim brojem C atoma (max pika na C₂₁).

Inicijalna biodegradaciona sposobnost izolovanih bakterijskih sojeva u odnosu na PAH jedinjenja ispitana je u smeši piren:fenantren (1:1 m/m), u eksperimentu koji je trajao deset dana. Mase preostalih PAH jedinjenja u smeši određena je gravimetrijski nakon čega su ekstrakti analizirani GC-MS hromatografijom.

Brzina biodegradacije PAH jedinjenja kod oba soja opada sa povećanjem broja prstenova [6]. Značajna biodegradacija pomoću *Rhodococcus sp.* uočena je već posle tri dana, dok je posle sedam dana ovaj soj razgradio 31,2% pirena, odnosno 84,8% fenantrena. Nakon toga, brzina biodegradacije opada tako da se do desetog dana razradi 36,8% pirena, odnosno 87,2% fenantrena. Značajna biorazgradnja fenantrena pomoću *Planomicrobium sp.* je zabeležena sedmog dana (33,2%), i do desetog dana ovaj soj je razgradio 43,2% ovog supstrata, dok je razgradnja pirena bila usporena i do desetog dana je razgradjeno 8% (Slika 3.). Zajedničko za oba soja je da u većoj meri razgrađuju fenantren, što je i očekivano imajući u vidu da je fenantren jednostavnije hemijske strukture u odnosu na piren.



Slika 3. GC-MS analiza biodegradacije smeše pirena i fenantrena pomoću *Planomicrobium sp.* RNP01 i *Rhodococcus sp.* RNP05

Primer 2. - Mikrobnna degradacija ugljovodonika motornog ulja pomoću mikroorganizama izolovanih iz zagađenih voda

Aktivni mulj postrojenja za preradu industrijskih otpadnih voda Rafinerije Nafta Pančevo, HIP Petrohemije i HIP Azotare u Pančevu poslužio je kao odličan izvor adaptiranih mikroorganizama za biodegradaciju motornog ulja.

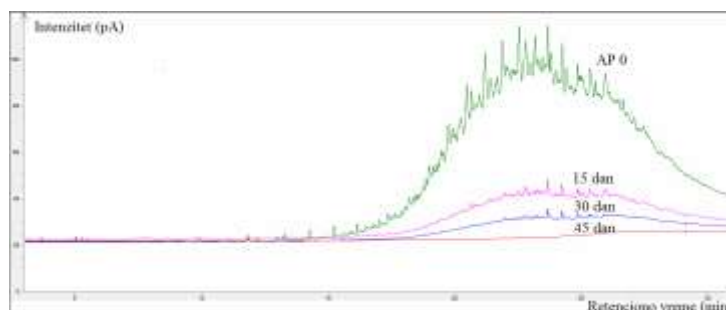
Nakon molekularno-biološke identifikacije, na primeru dva izolovana bakterijska soja označena kao *Lysinibacillus sp. AM1* i *Rhodococcus sp. AM2* (čije su rRNA nukleotidne sekvence najsličnije izolatima *Lysinibacillus sp.*, GenBank pristupni broj JN886714.1 i *Rhodococcus erythropolis*, KF358249.1, redom kako je navedeno), ispitivana je biodegradaciona aktivnost ovih mikroorganizama na motorno ulje kao supstrata u trajanju od 45 dana, koja je praćena GC analizom [7,8].

Obe identifikovane vrste su aerobne, gram-pozitivne, mezofilne bakterije. Enzim katalaza je prisutan kod oba soja, a izolovane bakterije nemaju sposobnost oksidacije i fermentacije šećera. Citohrom c oksidaza je prisutna kod soja *Rhodococcus sp. AM2*, dok *Lysinibacillus sp. AM1* ne poseduje ovaj enzim.

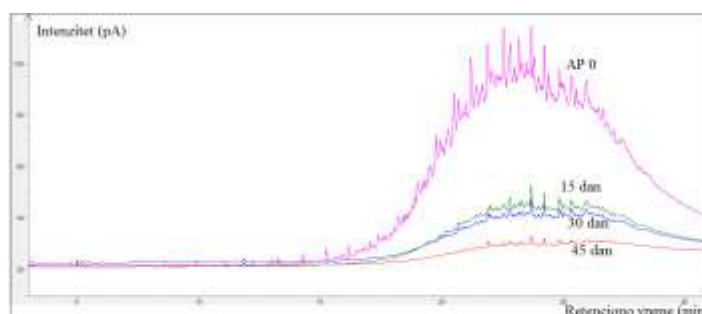
Bakterijski soj *Lysinibacillus sp. AM1* nakon 15 dana eksperimenta degraduje motorno ulje za 68,3%. Trend opadanja količine motornog ulja se nastavio, i nakon 45 dana degradovano je 98,4% motornog ulja (Slika 4.).

Količina motornog ulja koja je degradovana pomoću bakterijskog soja *Rhodococcus sp. AM2* u prvih 15 dana je 67,7%. Nakon 45 dana degradovano je 85,0% motornog ulja. Na Slici 5. su vidljivi pikovi koji potiču od nedegradovanog motornog ulja.

Analiziranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da je efikasnost biodegradacije motornog ulja nešto veća kod izololata *Lysinibacillus sp. AM1* u odnosu na soj *Rhodococcus sp. AM2*.



Slika 4. Gasni hromatogram biodegradacija motornog ulja pomoću bakterijskog soja *Lysinibacillus sp.*AM1



Slika 5. Gasni hromatogram biodegradacija motornog ulja pomoću bakterijskog soja *Rhodococcus sp.* AM2

UMESTO ZAKLJUČKA

Sudbina zagađujuće supstance u životnoj sredini nikad nije kontrolisana jednim procesom. Često nekoliko fizičkih, hemijskih i bioloških procesa deluje istovremeno, a koji proces će dominirati u nekom trenutku u datom okruženju zavisi od sastava i količine zagađujuće supstance koja je dospela u životnu sredinu, ali i od specifičnih karakteristika okruženja u kojem se nalazi.

Integrisana ispitivanja fizičkih i hemijskih karateristika zagađujućih supstanci i njihovog uticaja na biogeocenoze doprinose boljem razumevanju prirodnih procesa čišćenja kontaminiranih područja, što dalje povećava mogućnosti za iskorišćavanje mikroorganizama kao neprevaziđenih »bioloških agenasa« u postupcima sanacije i očuvanja životne sredine.

Navedeni primeri idu u prilog promociji bioremedijacionih postupaka koje koriste prirodne kapacitete sredine tj. mikroorganizme za sanaciju zagađenih područja, imajući u vidu da ovi postupci imaju veću efikasnost i manju cenu od ostalih/konkurentnih postupaka, pri čemu ne generišu dodatni otpad što je veoma važna osobina u današnjem, tehnološki i hemijski naprednom svetu u kome živimo.

Zahvalnica

Autori izražavaju zahvalnost Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, koje finansira i podržava naša istraživanja u okviru projekta III43004 i kompanijama Brem group d.o.o. i NRK Inženjering d.o.o. na dugogodišnjoj podršci u naučnom i eksperimentalnom radu.

LITERATURA

1. Massey R., Jacobs M., The Global Chemicals Outlook Towards Sound Management of Chemicals Chapter I: Trends and Indicators UNEP, ISBN: 978-92-807-3275-7, 2012.
2. Gallagher L. A., The Global Chemicals Outlook Towards Sound Management of Chemical Chapter II: Economic Implications of Trends in Chemicals Production, Trade and Use, ISBN: 978-92-807-3275-7, 2012.
3. Philp J.C., Atlas R.M., in: Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup, R.M. Atlas, J.C.Philp, Eds., ASM Press, Washington DC, 2005, p. 139
4. Ilić M., Antić M., Antić V., Schwarzbauer J., Vrvic M., Jovančičević B., Investigation of bioremediation potential of zymogenous bacteria and fungi for crude oil degradation, Environ. Chem. Lett. 9 (2011) 133.
5. Gojgic-Cvijovic G.D., Milic J. S., Solevic T. M., Beskoski V. P., Ilic M. V., Djokic L. S., Narancic T. M., Vrvic M. M., Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study, Biodegradation, 23 (2012) 1
6. McKew¹ B. A., Coulon F., Osborn A. M., Timmis K. N., McGenity T. J., Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK, Envir. Microbiol, 9 (2007) 165
7. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E., Prokaryotes, Springer, New York, 2006., p 530.

8. Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V., Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, *Environ. Int.* 35 (2009) 162.

Izvod

Proces industrijalizacije, kao posledica naučnih dostignuća i tehnološkog razvoja u mnogome je olakšao i unapredio uslove života u odnosu na period od pre dvesta godina. Uporedo sa razvojem došlo je i do povećanog generisanja otpada čija količina prevazilazi sposobnost prirode za samoprečišćavanjem. Posledica nagomilavanja otpada je narušavanje prirodne ravnoteže u biodiverzitetu, ugrožavanje održivog razvoja kao i štetan uticaj na ljudsko zdravlje i životnu sredinu.

Ekosistemi, odnosno biogeocenoze, su jedinstva životnog staništa (biotopa) i životne zajednice (biocenoze), u okviru kojih na specifičan način kruži materija i protiče energija. Mikroorganizmi iz svih biogeoeosfera (pre svega bakterije i gljive, ali i alge i protozoe) poseduju prirodnu sposobnost razgradnje i transformacije zagađujućih supstanci (bioremedijacioni potencijal), zahvaljujući neslućenom diverzitetu njihovog metabolizma i genetičkoj promenljivosti. Biološka degradacija i uklanjanje štetnih supstanci iz zemljišta, površinskih i podzemnih voda pomoću biogeocenoza predstavlja savremeni trend u sanaciji ovakvih zagađenja.

Kao ispravan pristup problemu bioremedijacije zagađenih područja, nameće se potreba za izolovanjem mikroorganizama iz kontaminirane sredine u cilju definisanja postupka za njihovo ponovno vraćanje u kontaminiranu sredinu radi njenog izlečenja. Adekvatna selekcija mikroorganizama, zatim ispitivanje efekata promene uslova sredine, fizičkog i hemijskog tipa, kao i optimizacija uslova u pogledu njihove efikasnosti u razlaganju supstrata su neophodni koraci uspešnog postupka izlečenja zagađene životne sredine.

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPA BOBIČASTOG VOĆA

Aleksandra Velićanski, Dragoljub Cvetković, Siniša Markov
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad

Bobičasto voće (jagoda, malina, kupina, borovnica, aronija i dr.) ima raznovrstan fitohemijski sastav koga čine minerali, vitamini, prehrambena vlakna, polifenolna jedinjenja, antocijani itd. Ove komponente doprinose brojnim terapijskim efektima bobičastog voća, kao što su antibakterijsko, antivirusno, antikancerogeno, antioksidativno, antiinflamatorno, antineurodegenerativno delovanje itd.

Tokom tehnološkog postupka proizvodnje i obrade voća i povrća zaostaje velika količina tropa, koji se sastoji od pulpe, semenki, pokožice itd. S jedne strane, trop predstavlja ekonomski deficit i ekološki problem, kao i značajan gubitak fitonutrijenata i biomase, ali takođe se koristi kao hrana za životinje, za proizvodnju prehrambenih vlakana i biogoriva, kao izvor prirodnih aditiva prehrambenim proizvodima i moguća zamena sintetičkih antioksidanasa.

Brojna istraživanja pokazala su da ekstrakti bobičastog voća poseduju antibakterijsku aktivnost, dok je antifungalna aktivnost manje izražena. Trop bobičastog voća do sada je ispitivan u svega nekoliko međunarodnih naučnih radova, dok je antimikrobna aktivnost tropa maline, kupine, borovnice i aronije uzgajanih na teritoriji Srbije predmet višegodišnjeg istraživanja. Ispitivanjima izvedenim disk difuzionom i agar difuzionom metodom, kao i određivanjem minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije, utvrđeno je antibakterisko delovanje tropa prema Gram-pozitivnim (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*) i Gram-negativnim bakterijama (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*). Antifungalno delovanje prema kvascima (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) i plesnima (*Aspergillus niger*, *Penicillium aurantiogriseum*) u većini slučajeva izostaje ili je aktivnost minimalna.

U ovom radu dat je pregled metoda koje su korišćene za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata tropa različitog bobičastog voća, ispitivanih test mikroorganizama, potencijalnih aktivnih komponenata i faktora koji utiču na antimikrobnu aktivnost.

Ključne reči: bobičasto voće, trop, antimikrobna aktivnost

Zahvalnost: Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu su deo projekta TR 31044 "Razvoj proizvoda i aditiva od voca i povrca sa visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja" finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA ACHROMOBACTER VRSTA IZOLOVANIH KOD PEDIJATRIJSKIH PACIJENATA

Filipić Brankica^{1,2}, Malešević Milka¹, Vasiljević Zorica³, Novović Katarina¹, Kojić Milan¹, Branko Jovčić^{1,4}

¹ Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

² Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

³ Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Republike Srbije "Dr Vukan Čupić", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

⁴ Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Achromobacter spp. su široko rasprostranjene u okruženju, prvenstveno u vodenoj sredini i zemljištu, a takođe su deo normalne fiziološke flore gastrointestinalnog trakta ljudi. Oportunistički su patogeni i izazivaju infekcije kod imunokompromitovanih osoba, uzrokujući meningitis, pneumoniju, sepsu, peritonitis kao i infekcije urinarnog trakta. Najčešće izolovana *Achromobacter* vrsta iz kliničkih uzoraka je *Achromobacter xylosoxidans*.

A. xylosoxidans, ranije označavan kao *Alcaligenes xylosoxidans*, je Gram-negativan, aeroban, pokretan bacil sa peritirihijelnim flagelama, koji ne razlaže laktozu. Prvi put je opisan 1971. godine, kada je izolovan kod pacijenta sa hroničnom upalom uha, a 1985. godine je povezan sa infekcijama kod obolelih od cistične fibroze (CF). Pored toga, može izazvati infekcije kod pacijenata sa različitim imunokompromitovanim stanjima, a opisani su i slučajevi unutarbolničkih infekcija posredstvom kontaminiranih dezinfekcionih sredstava i fizioloških rastvora (Vu-Thien et al., 1998; Tena et al., 2005). Patogeni potencijal, kao i vidovi širenja *A. xylosoxidans* su i dalje nerazjašnjeni.

A. xylosoxidans je prepoznat kao važan oportunistički patogen koji izaziva infekcije kod obolelih od cistične fibroze (CF). Cistična fibroza je bolest koja se nasleđuje autozomno recesivno i jedno je od najčešćih genetskih bolesti belaca, od koje oboljevaju i dečaci i devojčice. Deca se rađaju sa cističnom fibrozom i bolest se ne dobija tokom života. Karakteriše se promenama na plućima i pankreasu gde se stvara gusti, mukozni sekret koji može dovesti do zapušnja bronhiola i pankreasnih

kanala, što dovodi do čestih zapaljenja i insuficijencije ova dva organa. Sluz koja se stvara u plućima obolelih od CF je gusta i lepljiva, zapušava disajne puteve stvarajući pogodnu sredinu za rast mikroorganizama. Najčešći uzročnici infekcija kod pacijenata sa CF su *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* (Saiman and Siegel, 2004), ali poslednjih godina sve veći značaj dobijaju G-nefermentišući bacili *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* i *Burkholderia cepacia* complex (Steinkamp et al., 2005). Prvobitni izveštaji su pokazivali da je učestalost izolacije *A. xylosoxidans* 2000. godine bila oko 2%, dok je 2011. godine 21% obolelih od CF bilo inficirano sa *A. xylosoxidans* (Pereira et al., 2011) zbog čega *A. xylosoxidans* postaje predmet intenzivnih istraživanja.

Rezervoar izolovanih *A. xylosoxidans* je i dalje nepoznat. Mnogi pacijenti nose sopstveni soj, međutim, u nekim centrima opisani su i slučajevi unakrsne kontaminacije (Pereira et al., 2011) koja se javlja i kod većine drugih patogena prisutnih kod pacijenata sa CF.

Povećana učestalost izolacije *A. xylosoxidans* iz kliničkih uzoraka, najverovatnije je posledica intenzivne upotrebe cefalosporina novijih generacija na koje je ova bakterija uglavnom otporna. Generalno, *A. xylosoxidans* je rezistentan na širok spektar antibiotika, što značajno otežava terapiju infekcija koje izaziva (Almuzara et al., 2010). Prijavljeni su brojni slučajevi višestruko rezistentnih *A. xylosoxidans* kod imunokompromitovanih i pacijenata sa cističnom fibrozom (Traglia et al., 2012). Dugotrajna i česta terapija antibioticima kod obolelih od cistične fibroze i imunokompromitovanih pacijenata sa hroničnim infekcijama, usmerena ka nekim drugim, mnogo češćim patogenima, može biti objašnjenje za pojavu rezistentnih *A. xylosoxidans*, a samim tim i povećanu učestalost izolacije *A. xylosoxidans* iz kliničkih uzoraka.

Literaturni podaci vezani za *A. xylosoxidans* uglavnom obuhvataju prikaze slučajeva, dok su retke studije koje se odnose na patogeni potencijal i mehanizme rezistencije. Kako *A. xylosoxidans* preživljava, uspešno kolonizuje i izaziva hronične infekcije pluća kod pacijenata sa CF, ostaje da bude istraženo. Nekoliko faktora, poput formiranja biofilma, sposobnost rasta u anaerobnim uslovima, rezistencija na antibiotike i produkcija egzoenzima i toksina označeni su kao najznačajniji za neke od bolje ispitanih CF patogena, poput *P. aeruginosa* i *B. cepacia* complex.

Iako je poslednjih godina *A. xylosoxidans* predmet intenzivnih izučavanja, zbog povećane učestalosti izazivanja infekcija i pojave multirezistentnih sojeva, za područje Beograda i Srbije ne postoje literaturni podaci o analizi ove bakterijske vrste. Usled toga, cilj studije bio je da se izvrši analiza stanja datog područja. Izolati *Achromobacter* vrsta analizirani u ovoj studiji su prikupljeni u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu, u periodu od novembra 2012. godine do februara 2015. Studija obuhvata 26 izolata poreklom od pacijenata sa cističnom fibrozom (CF izolati), ali i 31 izolat poreklom od pacijenata koji su imali različita hronična stanja (non-CF izolati), a lečeni su na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta. CF izolati bili su poreklom pretežno iz sputuma pacijenata, a non-CF izolati iz respiratornog trakta obolelih (endotrahealni aspirat, bronhoalveolarni lavat, sputum i bris nosa). U okviru studije izučavane su karakteristike *A. xylosoxidans* od važnosti za epidemiologiju i virulentni potencijal, poput genomske varijabilnosti, produkcije biofilma, rezistencije na antibiotike i pokretljivosti.

Primenom 16S rDNK analize, izolati su okarakterisani kao *A. xylosoxidans* što je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima je *A. xylosoxidans* najčešća vrsta roda *Achromobacter* koja se izoluje iz kliničkih uzoraka. Nakon sečenja genomske DNK pomoću *XbaI* enzima urađena je genotipizacija elektroforezom u pulsirajućem polju (engl. Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) i utvrđeno je da nije došlo do klonalne distribucije između CF i non-CF izolata, tj. da nije došlo do interhumanog prenosa *A. xylosoxidans* u bolničkim uslovima.

Sledeći cilj istraživanja bio je da se utvrdi da li izolati stvaraju biofilm. Prema literaturnim podacima produkcija biofilma igra značajnu ulogu u preživljavanju bakterija u hroničnim CF infekcijama. Formiranje biofilma je fenotipska osobina koju mnoge bakterije koriste za preživljavanje i proliferaciju unutar domaćina, a istovremeno biofilm uzrokuje povećanu toleranciju na antibiotike i odbrambene mehanizme domaćina. U biofilmu, bakterije agregiraju u mikrokolonije obložene matriksom izgrađenim od polisaharida, DNK i proteina, što kod pacijenata sa hroničnim infekcijama otežava strategije lečenja ili ih čini nemogućim.

U uslovima testa koji je izveden, svega 3 izolata (5,17%) od ukupno 57 analiziranih nisu pokazala sposobnost produkcije biofilma. Ostali izolati, prema količini biofilma koju proizvode, merene na OD₅₇₀, podeljeni su u tri grupe (Stepanovic et al., 2007): jaki proizvođači biofilma (strong, S), umereni proizvođači (moderate, M) i slabi proizvođači biofilma (weak, W). 24,14% analiziranih *A. xylosoxidans*, svrstani su u grupu jakih proizvođača biofilma (S), dok 43,1% izolata pripada grupi M i 27,58% izolata grupi W.

Mnoge bakterije zahvaljujući pojačanoj produkciji flagela postaju izrazito pokretljive, što im povećava efikasnost u pronalaženju hranljivih materija, izbegavanju toksičnih agenasa i kolonizaciji novih dostupnih disajnih puteva. Svega 8% izolata iz CF grupe i čak 93,94% izolata poreklom iz non-CF grupe pokazali su sposobnost pokretljivosti formiranjem koncentričnih prstenova različitog dijametra na hranljivoj podlozi koja sadrži 0,3% agaraze.

Jedan od važnih faktora za preživljavanje infektivnih bakterija je njihova rezistencija na primenjene antibiotike. U poslednjih nekoliko godina, prijavljeni su brojni slučajevi infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima *A. xylosoxidans* i kod imunokompromitovanih osoba i kod pacijenata sa CF. Iako klinički izolati *A. xylosoxidans* često pokazuju višestruku rezistenciju, relativno mala pažnja koja je posvećivana ovom oportunističkom patogenu dovela je do toga da su mehanizmi nastanka rezistencije malo poznati.

U cilju određivanja profila rezistencije kod CF i non-CF izolata obuhvaćenih studijom, najpre je fenotipskim testovima ispitano prisustvo β -laktamaza proširenog spektra (extended spectrum β -lactamases-ESBLs) i metalo β -laktamaza (metallo β -lactamases-MBLs).

ESBL proizvođači su grupa Gram-negativnih bakterija koje produkuju β -laktamaze koje hidrolizuju širi spektar β -laktamskih antibiotika (uključujući peniciline i cefalosporine) u odnosu na jednostavne β -laktamaze. ESBL imaju sposobnost da inaktiviraju β -laktamske antibiotike koji imaju oksimino-grupu, poput oksimino-cefalosporina (npr. ceftazidim, ceftriakson, cefotaksim) kao i oksimino-monobaktam (aztreonam). Nisu aktivni protiv cefamicina i karbapenema, a najčeće gube aktivnost u prisustvu inhibitora β -laktamaza poput klavulonske kiseline i tazobaktama. Fenotipskim testom selektovano je 7 pozitivnih

CF kandidata i 16 pozitivnih non-CF izolata. Međutim, primenom TEM, SHV, OXA, CTX-M i VEB prajmera, nije potvrđeno prisustvo ESBL gena kod kandidata selektovanih fenotipskim testom. Ipak, kod dva non-CF izolata na genotipskom nivou potvrđeno je prisustvo *bla*_{CMY-2} gena koji kodira AmpC- β -laktamazu, klinički značajnu cefalosporinazu koja obezbeđuje i rezistenciju na inhibitore β -laktamaza (uključujući i klavulonsku kiselinu).

Metalo β -laktamaze hidrolizuju sve β -laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme (izuzev aztreonama). Opisano je nekoliko tipova MBL enzima, od kojih su NDM, IMP i VIM najrasprostranjeniji. Fenotipskim testovima dobijeno je 6 pozitivnih CF izolata i 13 pozitivnih non-CF izolata, međutim, primenom IMP, VIM, SIM i NDM prajmera, nisu detektovani geni koji kodiraju MBL enzime.

Disk difuzionom metodom antibiograma dobijeno je da veliki broj izolata pokazuje rezistenciju na tetraciklin, aminoglikozidne antibiotike (amikacin i gentamicin) i cefalosporin treće generacije ceftriakson, što je najverovatnije posledica urođene rezistencije (Bador et al., 2013). Iako je imipenem dugo bio lek izbora u terapiji infekcija izazvanih *A. xylosoxidans*, istraživanje je pokazalo da je svega oko polovina izolata osetljiva na ovaj antibiotik. Dobru osetljivost izolati su pokazali na ceftazidim i hloramfenikol.

Generalno, *A. xylosoxidans* je rezistentan na širok spektar antibiotika, što značajno otežava terapiju infekcija koje izaziva. Zbog toga su potrebna intenzivna izučavanja ove vrste. Dobro poznavanje lokalnih epidemioloških podataka od velikog je značaja da bi se utvrdilo da li postoji unakrsna kontaminacija i otkrio eventualni izvor infekcije, kao i za unapređenje ukupnih znanja o *A. xylosoxidans* koji je fokus istraživanja na globalnom nivou.

LITERATURA:

1. Almuzara M, Limansky A, Ballerini V, Galanternik L, Famiglietti A, Vay C (2010) In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35(1): 68-71.

2. Bador J, Amoureux L, Blanc E, Neuwirth C (2013) Innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-Type multidrug efflux pump, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(1): 603-5.
3. Pereira RH, Carvalho-Assef AP, Albano RM, Folescu TW, Jones MC, Leao RS, Marques EA (2011) *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 49(10): 3649-51.
4. Saiman L, Siegel J (2004) Infection control in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 57–71.
5. Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Krahla, Gielen J, Barmeier H, Emerging bacteria study group (2005) Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 4(1): 41–8.
6. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, DiBonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. (2007) Quantification of biofilm in microtiterplates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115: 891–9.
7. Tena D, Carranza R, Barberá JR, Valdezate S, Garrancho JM, Arranz M, Sáez-Nieto JA (2005) Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24(11): 727–32.
8. Traglia GM, Almuzara M, Merkier AK, Adams C, Galanternik L, Vay C, Centron D, Ramirez MS (2012) *Achromobacter xylosoxidans*: an emerging pathogen carrying different elements involved in horizontal genetic transfer. *Curr. Microbiol.* 65(6): 673-8.
9. Vu-Thien H, Darbord JC, Moissenet D, Dulot C, Dufourcq JB, Marsol P, Garbarg-Chenon A (1998) Investigation of an outbreak of wound infections due to *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by chlorhexidine in a burns unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17(10): 724-6.

SAZNANJA IZ DETALJNE ANALIZE LIPIDOMA ODABRANIH SOJEVA RODA *STREPTOMYCES*

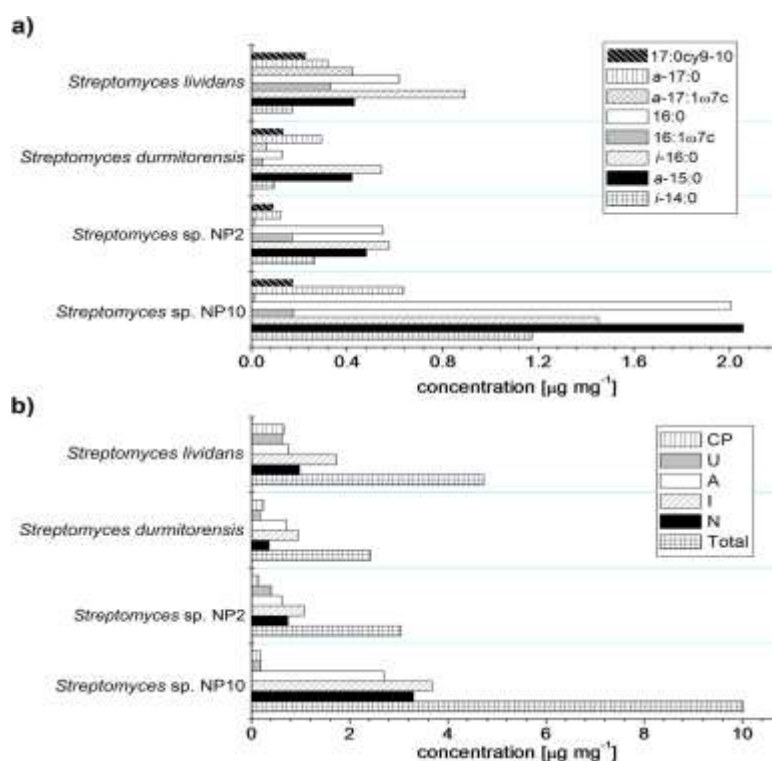
Tatjana Ilić-Tomić

Laboratorija za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd

Bakterije roda *Streptomyces* su karakteristične po svojoj morfološkoj kompleksnosti kao i po sposobnosti da proizvode hemijski različite sekundarne metabolite uključujući dve trećine klinički korisnih antibiotika, kao i mnoge druge značajne agense sa antikancer, antifungalnim, antihelminskim ili imunosupresivnim delovanjem. Streptomicete predominantno naseljavaju zemljište, jedno od mikrobiološki najraznovrsnijih staništa na planeti. Da bi preživele u tako kompleksnom ekosistemu ove bakterije su morale da pronađu način da prevaziđu brojne fizičko-hemijske i biološke izazove. Ekološka funkcija brojnih sekundarnih metabolita iz streptomiceta je u odbrani staništa i resursa od drugih mikroorganizama koji prete da zauzmu njihovu nišu. Održavanje membranske lipidne homeostaze je neophodno za bakterijsko preživljavanje i adaptaciju na različite uslove sredine. Streptomicete su razvile mehanizme kojim kontrolišu sintezu masnih kiselina kao i modifikaciju strukture postojećih masnih kiselina zavisno od spoljašnjih faktora.

Masne kiseline su u bakterijskoj ćeliji zastupljene u membrani, kao acilni ostatak fosfolipida, mada su u neznatnoj količini prisutne u membrani i u slobodnoj formi (Kaneda, 1991). Analiza profila vezanih masnih kiselina je danas široko prihvaćena kao korisna metoda u taksonomskim studijama i za identifikaciju novih bakterijskih vrsta. Biosinteza masnih kiselina kod streptomiceta se oslanja isključivo na FAS II monofunkcionalni enzimski sistem. Ovaj enzimski sistem se kod nekih streptomiceta razvio, uz neznatne modifikacije, u enzimski sistem odgovoran za produkciju bioaktivnih poliketidnih jedinjenja (PKS II) (Gago et al., 2011, Florova et al., 2002). Detaljna analiza lipidoma četiri različite streptomicete iz laboratorijske kolekcije: *Streptomyces* sp. NP10, *Streptomyces durmitorensis*, *Streptomyces* sp. NP2 i *Streptomyces lividans* je urađena u našoj laboratoriji uz pomoć kolega sa Odseka za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu (Ilić-Tomić et al., 2015). Ova analiza, koja je obuhvatala hromatografske izolacije, NMR merenja, derivatizacije,

hemijske transformacije i GS-MS spektrometriju, je omogućila identifikaciju preko 50 različitih, zasićenih, nezasićenih i ciklopropanskih masnih kiselina sa *n*-, *iso*- i *anteiso*- lancima. Najzastupljenije među njima su bile *i*-14:0, *a*-15:0 i 16:0. Analiza je pokazala da soj *Streptomyces* sp. NP10 proizvodi neuobičajeno visoku količinu masnih kiselina u slobodnoj formi, 2-4 puta više u poređenju sa ostala tri ispitivana soja kao i to da ove slobodne masne kiseline može da akumulira i ekskretuje u medijum kao sekundarne metabolite, što predstavlja fenomen nezabeležen u literature (Slika 1.) Takođe, po prvi put je u nekom mikroorganizmu pokazano prisustvo epoksi masnih kiselina. Zahvaljujući svojoj specifičnoj kvantitativnoj i kvalitativnoj kompoziciji masnih kiselina u ćeliji, soj NP10 ima karakteristiku netipičnu za streptomicete, a to je da raste na +4 C. Pored kriotolerancije, soj NP10 pokazuje toleranciju na osmotski i alkalni stres koja je najverovatnije postignuta zahvaljujući visokom sadržaju *iso*- i *anteiso*-masnih kiselina u membrani (43.5% i 24.3%).



Slika 1. Profil slobodnih masnih kiselina četiri različita soja streptomiceta

A) Distribucija glavnih masnih kiselina. B) Distribucija nekih klasa masnih kiselina. N-normalni niz, I iso, A anteiso, U nezasićene i CP ciklopropanske kiseline.

Studija je pokazala da od 59 identifikovanih slobodnih masnih kiselina kod četiri ispitivana soja, dve predstavljaju potpuno nove prirodne proizvode. To su ciklopropanske masne kiseline razgranatog niza *i*-17:0cy9-10 i *a*-18:0cy9-10. Takođe, analiza je pokazala prisustvo monoenoic masnih kiselina razgranatog lanca koje se retko nalaze u prirodi, *i*-16:1ω6c, *a*-17:1ω7c, *i*-18:1ω8c i *a*-19:1ω9c, kao i prisustvo masnih kiselina koje su po prvi put nađene kod bilo kog mikroorganizma *i*-18:1ω8c i 13:1ω9c. U ovoj studiji je po prvi put potvrđeno da masna kiselina 11:1ω1 koja je identifikovana kod drugih organizama, može biti sintetisana i od strane bakterija. Takođe, identifikovane masne kiseline poput *i*-22:0, 3-OH-8:0, 3-OH-10:0 i 10-oxo-18:0 predstavljaju potpuno nove metabolite roda *Streptomyces*.

Kako zadnjih godina postoji trend da se fosilna goriva zamene biogorivima kao ekološki prihvatljivim, upotreba mikroorganizama koji imaju sposobnost produkcije i akumulacije masnih kiselina može biti alternativa tradicionalnoj hemijskoj sintezi u proizvodnji biogoriva. Korišćenjem mikrobijalne biomase koja ima sposobnost ekskrecije lipida u medijum, kao što je to slučaj sa *Streptomyces* sp. NP10, ceo proces proizvodnje bi se pojednostavio što bi direktno uticalo na snižavanje troškova proizvodnje.

REFERENCE

1. Kaneda T (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* 55:288–302
2. Gago G, Diacovich L, Arabolaza A, Tsai S-C, Gramajo H (2011) Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* 35:475–497. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00259.
3. Ilic-Tomic T, Gencic M, Zivkovic M, Vasiljevic B, Djokic L, Nikodinovic-Runic J, Radulovic N (2015) Structural diversity and possible functional roles of free fatty acids of the novel soil isolate *Streptomyces* sp. NP10. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-014-6364-5

KARAKTERIZACIJA *CRONOBACTER SPP.* IZOLOVANOG IZ BILJNIH ČAJEVA

prof. dr Vera Katić*; Dr sci vet. med. Marija M. Stojanović**

* Fakultet veterinarske medicine, Beograd

** Centar za ispitivanje namirnica d.o.o, Beograd

Cronobacter sakazakii, do 2007. godine poznat kao *Enterobacter sakazakii*, je patogeni mikroorganizam, koji prenet putem hrane, može da izazove oboljenje odojčadi sa smrtnim ishodom. Osnovni izvor infekcije su formule za odojčad u prahu u kojima ova bakterija može da se održava duže vreme zbog specifičnih osobina kao što su: otpornost na nisku a_w , promenu pH visoku osmotsku koncentraciju, termorezistentnost, i sposobnost stvaranja egzopolisaharida. Oboljenje izazvano ovom bakterijom je do 1990. godine uglavnom dijagnostikovano kod novorođenčadi a od tada do danas bolest je dijagnostikovana kod dece i odraslih osoba sa oslabljenim imunološkim sistemom.

Stoga je cilj ovog rada bio da se ispita prisustvo *Cronobacter sakazakii* u formulama za odojčad i biljnim čajevima, koji se po tradiciji koriste kod osoba sa oslabljenim imunološkim sistemom, kao i da se uradi analiza diverziteta izolata *Cronobacter spp.*

Ispitano je 360 uzoraka mleka za odojčad i 520 uzoraka čaja različitog porekla, a posebna pažnja posvećena je čajevima za decu i odojčad, kao i biljnim čajevima koji se prelivaju vodom ispod 72°C. Termorezistentnost *Cronobacter sakazakii* izolovanih iz biljnih čajeva, koji se u pripremi prelivaju hladnom vodom, ispitana je u čaju pripremljenom sa vodom zagrejanom na temperaturu 60 °C i 72 °C, kao i ključalom vodom. Postojanost izolata *Cronobacter sakazakii* u već napravljenim čajevima, koji se drže na sobnoj temperaturi (22-24°C) ispitana je posle 48 i 72 sata, a u uzorcima čaja držanim pri temperaturi frižidera (4°C) ispitana je posle 7, 14 i 21 dana. Za izolaciju *Cronobacter sakazakii* je korišćena standardna metoda ISO/TS 22964. Fenotipizacija izolata *Cronobacter sakazakii* je urađena primenom komercijalnog testa API 20E. U okviru genetičkih istraživanja izvršen je izbor reprezentativnih izolata i selekcija metoda za izolaciju DNK. Fragmenti DNK su umnožavani metodom lančane reakcije polimeraze (Polymerase chain reaction- PCR). Ova *in vitro* tehnika korišćena je za: 1. amplifikaciju različitih delova genoma koji obezbeđuju DNK fingerprinting (rep-PCR i RAPD) i 2. amplifikaciju ciljne sekvence (16S rDNA). Za

razdvajanje umnoženih fragmenata DNK molekula, na osnovu njihove veličine i naelektrisanja, korišćen je metod gel-elektroforeze. Za analizu diverziteta korišćena je rep-PCR metoda sa specifičnim sekvencama - repetitivnim elementima DNK: ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) i BOX elementa. Pri ERIC amplifikaciji korišćen je set prajmera ERIC 1R/2. U okviru BOX tipa rep-PCR korišćen je (GTG)₅ prajmer (de Bruijn, 1992). Za amplifikaciju 16S rDNA korišćeni su univerzalni prajmeri fD1/rD1, a amplifikovani fragmenti su prečišćeni i sekvencirani (Weisburg et al. 1991). Sličnost sa referentnim sojevima, *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155 kliničkim izolatom iz grupe najpatogenijih i *Cronobacter muytjensii* ATCC 51328 manje patogenosti, urađena je primenom rep-PCR metode.

Cronobacter spp. nije izolovan ni iz jednog od 360 uzoraka hrane za odojčad u prahu. Prisustvo ove bakterije je dokazano u 193 (38%) od 520 ispitanih uzoraka čaja. Najčešće je *Cronobacter* spp dokazan u uzorcima čajeva za decu (52% uzoraka), zatim „bebi“ čajevima (44% uzoraka) i mešavinama napravljenim za imunokopromitovane osobe (38% uzorak). Za ispitivanje uticaja temperature na rast *Cronobacter sakazakii* korišćeni su izolati iz belog sleza, bebi čaja i mešavine biljaka koja je preporučena da se koristi kod gastrointestinalnih poremećaja. Svi ispitivani izolati *C. sakazakii* su preživljavali u supstratima čaja pri temperaturi od 60°C, 72°C i temperaturi ključale vode. Najveće smanjenje broja *C. sakazakii* je postignuto delovanjem temperature ključale vode u vremenu od dva minuta. Svi ispitivani izolati su preživeli 72 sata pri sobnoj temperaturi (23±1°C) i 21 dan na temperaturi frižidera (+4°C). Rezultati održivosti ove bakterije u biljnim čajevima namenjenim za odojčad i osobe sa oslabljenim imunitetom, mogu se koristiti u proceni rizika od infekcije *Cronobacter sakazakii* putem čajeva. Upotrebom (GTG)₅ prajmera za BOX-PCR i seta prajmera ERIC 1R/2 dobijeni su reproducibilni profili izolata, a na osnovu njihovog poređenja izolati su grupisani u 3 grupe. Dokazana je velika sličnost ispitivanih izolata sa referentnim sojem R2, *Cronobacter sakazakii* NCTC 8155, koji je jedan od najpatogenijih kliničkih sojeva, izolovan iz mozga novorođenčeta. Referentni soj R1- *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329, manje patogenosti od soja R2, izdvojen je od ostalih u posebnu grupu na osnovu rep-PCR. Amplifikacijom 16S rDNK, sekvenciranjem i poređenjem sa deponovanim sekvencama 16S rRNK gena u NCBI bazi podataka, potvrđena je identifikacija reprezentativnih izolata M1, K2, K5 i S11 kao *Cronobacter sakazakii*.

Ključne reči: *Cronobacter sakazakii*, biljni čajevi, karakterizacija, RAPD, rep-PCR

TRANSMISIJA NOROVIRUSA I HEPATITS A VIRUSA U TOKU RUKOVANJA SA HRANOM

Dragoslava Radin¹, Branko Velebit²

¹Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

²Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija

Različiti enterični virusi mogu se smatrati potencijalnim kontaminantima hrane, zbog njihove sposobnosti da se umnožavaju u gastrointestinalnom traktu ljudi i konsekvatno oslobađaju u izuzetno velikom broju u fecesu zaraženih pojedinaca. Virusi postaju zagađivači životne sredine koji mogu kontaminirati različite namirnice u primarnoj proizvodnji, pri čemu su pod najvećim rizikom bobičasto voće (maline, jagode) i lisnato povrće (zelena salata).

U alimentarnim virusnim epidemijama dominiraju norovirus (NoV) i hepatitis A virus (HAV), sa više od 40% epidemija povezanih sa svežim voćem i povrćem.

Oralno-fekalni put prenosa, naročito preko ruku zaraženih radnika koji manipulišu hranom, jasno je identifikovan i čini 42,5% svih alimentarnih norovirusnih epidemija. Opstanak virusa na jastučićima prstiju je visok, i prenošenje na površine od nerđajućeg čelika, a zatim i na površinu prehrambenih proizvoda je relativno lako.

Analizom 816 alimentarnih epidemija koje su bile povezane sa radnicima koji rukuju hranom, ustanovilo se da su norovirusi dominantni etiološki agensi, a kompleksna hrana sastavljena od više sastojaka u najvećem riziku. Kontakt golim rukama i neodgovarajuća higijena je faktor koji dovodi do uključivanja zaraženih radnika. Svakako, u velikoj meri doprinosi činjenica da NoV imaju vrlo malu infektivnu dozu i da su izuzetno stabilni u spoljašnjoj sredini i na površinama koje su u kontaktu sa hranom.

NoV i HAV imaju sposobnost da se pripoje kako za inertne površine tako i za različite matrikse hrane. Virusi mogu da prežive na površini svežih proizvoda posle berbe, i ostaju infektivni nekoliko dana ili čak do 5 nedelja tokom čuvanja u domaćinstvu ili komercijalnog skladištenja. Na

površinama koje su u dodiru sa hranom tokom pripreme mogu se detektovati do 7 dana posle kontaminacije.

Sličan primer je unakrsna kontaminacija sa opreme, koja može da prenese viruse na sedam sukcesivno prerađenih proizvoda. Potrebno je da se uskladi lična higijena radnika, adekvatna sanitacija i kvalitet vode u proizvodnji i prehrambenim pogonima.

Ključne reči: norovirus, HAV, transmisija

PRIMENA DOBRE HIGIJENSKE PRAKSE KOD MALOG OBIMA PROIZVODNJE I TRADICIONALNIH PROIZVOĐAČA HRANE ŽIVOTINJSKOG POREKLA

Nedeljko Karabasil¹, Tamara Bošković², Mirjana Dimitrijević¹

¹Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

²Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, Uprava za veterinu

U Republici Srbiji postoji veliki broj objekata koji su na određeni način u vezi sa proizvodnjom, preradom i prometom mesa. Mogu grubo da se podele na objekte za klanje životinja i objekte u kojima se samostalno ili kombinovano obavlja i rasecanje i/ili prerada mesa. Step en i stvarna iskorišćenost objekata je trenutno najčešće ispod projektovanog kapaciteta.

Glavni cilj opštih i posebnih propisa o higijeni hrane u Evropskoj uniji, kao i u Srbiji je da se obezbedi visok nivo zaštite potrošača u pogledu bezbednosti hrane. Ovi propisi sadrže zajednička načela, naročito u odnosu na subjekte u poslovanju hranom i nadležne organe u smislu odgovornosti, kao i strukturne, operativne i higijenske uslove za proizvođače, uključujući postupke za registraciju i odobravanje objekata.

Zahtevi u smislu propisa o opštim i posebnim pravilima o higijeni hrane, tzv. "Higijenski paket", uglavnom su fokusirani na objekte velikog kapaciteta, koji imaju resurse i logistiku da ispune potrebne zahteve. U takvim okolnostima, mali proizvođač nije ravnopravan, ukoliko se ne primene pravila fleksibilnosti prema nacionalnim opštim i posebnim propisima higijene hrane i propisi o dobrobiti životinja. To znači da bi trebalo da se nacionalnim merama obuhvati prilagođavanje (fleksibilnost) određenih zahteva ili izuzeća (odstupanja) od određenih specifičnih zahteva definisanih u higijenskom paketu u navedenim okolnostima, kod malog obima i uslovima tradicionalne proizvodnje.

Ove mere bi omogućile: dalju primenu tradicionalnih metoda u svakoj fazi proizvodnje, prerade ili distribucije hrane životinjskog porekla; lakše poslovanje u oblastima u kojima postoje posebna geografska ograničenja (teško pristupačne planinske oblasti); fleksibilnost u pogledu izgradnje, uređenja i opremanja objekata malog kapaciteta; uslove pod kojima

subjekti u poslovanju hranom životinjskog porekla koji koriste mere prilagođavanja propisane ovim pravilnikom mogu da stavljaju na tržište/u promet hranu životinjskog porekla iz ovih objekata.

Ključne reči: higijena, fleksibilnost, tradicionalna proizvodanja, mali obim proizvodnje

UČESTALOST AFLATOKSINA U HRANI U SRBIJI

Sunčica Kocić-Tanackov, Gordana Dimić, Marija Škrinjar
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad

Kontaminacija hrane aflatoksigenim gljivama i aflatoksinima predstavlja i danas veliki problem za bezbednost hrane. Aflatoksini predstavljaju, sa aspekta uticaja na zdravlje ljudi i životinja, najznačajniju grupu fungalnih toksičnih metabolita. Radi se o ekstracelularnim sekundarnim metabolitima najčešće vrsta *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*.

Brojna istraživanja ukazuju na pojavu aflatoksigenih gljiva i aflatoksina u različitim namirnicama biljnog i životinjskog porekla, kao i u hrani za životinje. Alimentarnim unošenjem aflatoksina u organizam životinja i ljudi nastaju aflatoksikoze, koje se manifestuju toksičnim, imunosupresivnim, teratogenim i kancerogenim delovanjem. Pre svega, oštećuju morfološku i funkcionalnu strukturu ćelija jetre i drugih parenhimatoznih organa i izazivaju karcinom jetre.

Prema dostupnoj literaturi u našoj zemlji i našim istraživanjima, aflatoksini su se pojavljivali sporadično u hrani i stočnoj hrani. Međutim, u 2012. godini došlo je do incidentne pojave aflatoksina u kukuruzu i mleku, i to u mnogo višim koncentracijama od maksimalno dozvoljenih propisanim našim pravnim aktima, kao i vrste *A. flavus*, kao najznačajnijeg proizvođača ovog mikotoksina. S toga, ovaj rad daje pregled najznačajnijih aflatoksina, njihove biološke efekte, pod kojim uslovima se biosintetišu, rasprostranjenost u hrani u našoj zemlji na osnovu dostupne literature i naših dugogodišnjih istraživanja, sa posebnim osvrtom na njihov nalaz danas, uključujući i zakonsku regulativu koja se odnosi na maksimalno dozvoljene koncentracije ovih toksičnih metabolita u hrani.

Ključne reči: aflatoksini, hrana, rasprostranjenost

Zahvalnost: Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu su deo projekta TR 31017 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, i projekta br. 114-451-1521/2014-03 finansiranog od strane Pokrajnskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Autonomne pokrajne Vojvodine, Republika Srbija.

MIKROBIOLOŠKI KRITERIJUMI I BEZBEDNOST HRANE U REPUBLICI SRBIJI – AKTUELNA SITUACIJA

Dr Svetlana Raketić, Dr Vesna Šumanov
Zavod za javno zdravlje Čačak

Ministarstvo poljoprivrede RS je 2009. godine donelo Zakon o bezbednosti hrane, po kome glavnu odgovornost za bezbednost hrane imaju subjekti u poslovanju hranom. Hrana ne sme biti u prometu ako nije bezbedna. Sa mikrobiološkog aspekta to znači da ne sme sadržati mikroorganizme, njihove toksine i metabolite u količini koja predstavlja neprihvatljiv rizik za zdravlje ljudi. Mikrobiološki kriterijumi za hranu su propisani Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl. Glasnik72/2010).

Obzirom da Pravilnik (Sl. Glasnik72/2010), kao i regulativa EU 2073/2005, sadrži mikrobiološke kriterijume samo za određene kombinacije mikroorganizama i kategorija hrane, pokazalo se kao neophodno da se definišu dodatni, nacionalni mikrobiološki kriterijumi higijene, sa kojima bi se postigla bolja kontrola procesa i osigurala bezbednost hrane. Zemlje članice EU su problem nedostatka definisanih mikrobioloških kriterijuma rešavale na različite načine, ali je krajnji rezultat bio svuda isti: donete su smernice i vodiči koji su detaljno definisali mikrobiološke kriterijume higijene procesa za sve značajne kategorije hrane. Ministarstvo poljoprivrede RS je u skladu sa svojim ingerencijama, objavilo na sajtu Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma, koji sadrži dodatne, preporučene kriterijume higijene procesa.

Posle višegodišnje primene novih propisa, postavlja se pitanje kakvi su rezultati postignuti, da li ima stručnih dilema, a posebno, da li je primenom novih mikrobioloških kriterijuma postignut osnovni cilj Zakona o bezbednosti hrane- obezbeđenje visokog nivoa zaštite zdravlja ljudi?

Obzirom da je primenom novih propisa došlo do veoma značajnih promena u načinu kontrole hrane, bilo je očekivano da će doći i do pojave problema u njihovoj implementaciji. Najznačajniji problemi u vezi sa primenom mikrobioloških kriterijuma su:

1. potpuni nedostatak mikrobioloških kriterijuma za određene kategorije hrane
2. nepotpuni mikrobiološki kriterijumi za određene kategorije hrane
3. neadekvatni limiti za određene mikrobiološke kriterijume
4. neadekvatne metode za određene mikrobiološke kriterijume
5. nedefinisan broj jedinica koje čine uzorak za SUPH koji imaju mali obim proizvodnje

Sve napred navedeno je rezultiralo u potpunom nedostatku harmonizovanih mikrobioloških kriterijuma higijene procesa za veoma značajne kategorije hrane, što su subjekti u poslovanju hranom, nadležni organi i analitičari interpretirali na različite načine: od toga da, nedostatak definisanih kriterijuma znači da ispitivanje nije potrebno vršiti, do ispitivanja različitih kriterijuma, sa različitim limitima za iste kategorije hrane, što sprečava bilo kakvu sledljivost i upravljanje mikrobiološkim rizicima vezanim za hranu.

Uz postojeći problem nedefinisane nadležnosti na nivou države za kontrolu hrane u prometu, jasno je da je bezbednost hrane (u smislu postojanja velikih mikrobioloških rizika koji nisu pod kontrolom ni SUPH, ni države) veoma ugrožena.

Neophodno je što pre izvršiti reviziju preporučenih kriterijuma higijene procesa u Vodiču ministarstva poljoprivrede angažovanjem multidisciplinarnog tima, čime će se ispraviti navedeni nedostaci i poboljšati mikrobiološka kontrola hrane, a samim tim, smanjiti rizici za nastanak epidemija i obezbediti očuvanje i unapređenje zdravlja stanovništva.

USMENE PREZENTACIJE

MIKROMED 2015

NOVI BIOMARKERI U DIJAGNOSTICI HPV INFEKCIJE

Vesna Milošević¹, Gordana Kovačević¹

¹ Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, Srbija

Perzistentna infekcija grlića materice Humanim papiloma virusima (HPV) visokog onkogenog potencijala je jedan od etioloških faktora u nastanku raka grlića materice. Maligni proces se razvija duži niz godina, a predhode mu prekancerozne lezije, te je veoma važno prepoznati one koje imaju rizik progresije u invanzivni karcinom.

Zahvaljujući brojnim biomarkerima moguće je pratiti specifične faze u prirodnom toku HPV infekcije (L1 protein, odnos E2/E6-E7 proteina, mRNA profil, metilacioni profil) ili promene u ćelijskom ciklusu domaćina (proteini p16/Ki67, minihromosom protein (MCMs), topoisomerasa IIA (TOP2A), ciklooksigenaza (COX) itd). Poslednjih godina tehnikom DNK čipova (DNA microarray) vrši se analiza genske ekspresije u fiziološkim i patološkim stanjima. Uočeni su specifični obrasci genske ekspresije tokom razvoja mnogih maligniteta, uključujući i karcinoma grlića materice. Istraživane su male nekodirajuće RNK (miRNK) u prosecu kancerogeneze.

Brojne studije su pokazale da miRNA utiču na ekspresiju gena domaćina, kroz represiju translacije ili dovode do degradacije mRNA, kao i da svaki tip tumora, ili prekancerozna promena ima svoju „paletu” miRNK. Novi molekularni markeri omogućiće ranu detekciju bolesti u asimptomatskim stanjima. Pored toga, biomarkeri mogu biti značajni i u praćenju efikasnosti terapije. Ukoliko se adekvatno razviju i validiraju, molekularni biomarkeri će doprineti smanjenju incidence karcinoma grlića materice.

Ključne reči: HPV, karcinom grlića materice, biomarker

**KREDIBILITET LABORATORIJSKIH REZULTATA KAO
PROIZVOD STANDARDIZACIJE LABORATORIJSKOG RADA,
REDOVNOG UČEŠĆA U TESTIRANJU OSPOSOBLJENOSTI I
MEĐULABORATORIJSKOG POREĐENJA REZULTATA:
PRIMER TESTIRANJA POTENCIJE HUMANOG
ANTIRABIJSKOG IMUNOGLOBULINA BRZIM TESTOM
INHIBICIJE FLUORESCENTNIH FOKUSA**

Srđan Stankov, Nenad Vranješ, Verica Simin, Dragana Vujin, Dušan Lalošević
ZARZ Pasterov zavod, Novi Sad

Brzi test inhibicije fluorescentnih fokusa (RFFIT) koristi se prema uputstvu Evropske farmakopeje za testiranje potencije humanog antirabijskog imunoglobulina (HRIG). S obzirom na potrebu da se potencija HRIG-a odredi sa maksimalnom tačnošću i preciznošću s jedne strane, kao i na relativno veliku inherentnu varijabilnost RFFIT-a s druge strane, neophodno je da se za svaki uzorak HRIG-a izvrši ponovljeno testiranje u minimum tri sukcesivna testa, u laboratoriji u kojoj je RFFIT uključen u obim akreditacije po laboratorijskom standardu ISO 17025 ili ISO 15189, koja bar jednom godišnje učestvuje u testiranju osposobljenosti za ovaj test i koja je u slučaju bilo kakve sumnje u dobijeni rezultat spremna na međulaboratorijsko poredjenje spornih rezultata.

Na relativno skorom primeru određivanja potencije HRIG-a pokazalo se da se svi navedeni faktori moraju imati u vidu prilikom ocenjivanja kredibiliteta laboratorije i prezentovanih rezultata. Testiranje potencije serije HRIG-a proizvodnje Instituta za transfuziju krvi Srbije pripremljene u toku 2014. godine komparativno je radjeno u tri evropske laboratorije, i to u Nemačkoj, Švajcarskoj i Belgiji, zajedno sa testiranjem u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za besnilo u Pasterovom zavodu. Statistička analiza dobijenih rezultata pokazala je saglasnost rezultata između laboratorije Pasterovog zavoda i laboratorije u Švajcarskoj, dok su rezultati za svaku od druge dve laboratorije značajno odstupali u odnosu na rezultate svih drugih laboratorija.

Ključne reči: kredibilitet laboratorijskih rezultata, HRIG, RFFIT, reproducibilnost

VARIJABILNOST EBNA-1 GENA U IZOLATIMA EPSTEIN BARR VIRUSA KOD PACIJENATA U SRBIJI

Ana Banko¹, Ivana Lazarević¹, Goran Stevanović², Miljan Folić³, Maja Ćupić¹, Tanja Jovanović¹

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Klinika za infektivne i tropske bolesti, Klinički centar Srbije

³ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Klinika za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju, Klinički centar Srbije

UVOD i CILJEVI: Varijabilnost EBNA-1 gena Epstein Barr virusa (EBV) definisana je identifikacijom pet EBNA-1 subtipova na osnovu različitih aminokiselina na kodonu 487: dva prototipa, P-ala i P-thr i 3 varijante V-val, V-pro, V-leu. Varijanta V-ala dodatak je osnovnoj klasifikaciji. Daljom analizom dobijene su i subvarijante na osnovu dodatnih substitucija. Brojne studije upućuju na zaključak da EBNA-1 varijabilnost omogućava različit tropizam virusa, odnosno širok spektar maligniteta. Pored toga, utvrđena je različita geografska distribucija EBNA-1 subtipova. Ciljevi ove studije bili su određivanje EBNA-1 subtipova, identifikacija novih i geografski specifičnih mutacija, kao i utvrđivanje moguće povezanosti varijabilnosti EBNA-1 gena i prirode oboljenja.

MATERIJAL I METODE: Studija je obuhvatila 360 pacijenata sa infektivnom mononukleozom (IM), transplantiranim organom (T) ili nazofaringealnim karcinomom (NFK) tipa UCNT (engl. undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type). Korišćeni su uzorci krvi IM i T pacijenata, kao i parafinski kalupi tkiva UCNT pacijenata. Nested-PCR metodom dokazivan je EBNA-1 gen, iza čega je sledila filogenetska analiza dobijenih sekvenci. Obradene sekvence koristile su se i za poređenje sa kliničkim parametrima pojedinačnih oboljenja. Za statističku obradu podataka korišćene metode deskriptivne statistike, χ^2 test i Spirmanov test korelacije ranga.

REZULTATI: Identifikovana su 4 EBNA-1 subtipa: P-thr (59,8%), P-ala (36,8%), V-val (1,1%) i V-ala (2,3%). Distribucija subtipova nije se razlikovala među oboljenjima. Najčešći subtip P-thr, dalje je klasifikovan u 6 subvarijanti (sv-1 do sv-6) pri čemu su P-thr-sv-2, P-thr-sv-4, P-thr-

sv-5 i P-thr-sv-6 novoidentifikovane subvarijante. Statističkom analizom dokazana je značajna razlika u učestalosti P-thr subvarijanti po grupama pacijenata sa različitim oboljenjima ($p < 0,001$), pa je tako najučestalija P-thr-sv-5 bila prisutna samo u grupi pacijenata sa UCNT. Novootkrivena mutacija u tripletu GTT, koji kodira Val na poziciji 483, karakteristika je novootkrivene subvarijante V-val-sv-1.

ZAKLJUČAK: Distribucija identifikovanih EBNA-1 subtipova nije bila povezana sa određenim oboljenjem. Ipak, utvrđeno je 5 novih subvarijanti, među kojima je P-thr-sv-5 dokazana kao specifična samo za UCNT isolate.

Ključne reči: Epstein-Barr virus (EBV), EBNA-1, subtip

REKONSTRUKCIJA EVOLUCIONOG POREKLA I FILOGEOGRAFSKA ANALIZA VIRUSA KRIMSKE-KONGO HEMORAGIJSKE GROZNICE NA OSNOVU S GENSKOG SEGMENTA

Valentina Nikolić¹, Gorana Stamenković², Marina Šiljić¹, Ana Gligić³, Maja Stanojević¹

¹Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

²Institut za medicinska istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu, Srbija

³Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd, Srbija

CILJEVI: Virus Krimske-Kongo hemoragične groznice (VKKHG), pripadnik familije *Bunyaviridae*, rod *Nairovirus*, poseduje jednolančani negativni RNK genom koji se sastoji iz tri segmenta (L, M, i S segmenti). VKKHG je uzročnik Krimske-Kongo hemoragijske groznice, zoonoze koja se prenosi ujednom zaraženog krpelja. Ovaj virus ima karakterističnu geografsku distribuciju, koja uključuje Afriku i Evroaziju, od Balkanskog poluostrva do Dalekog Istoka. VKKHG je jedan od najvarijabilnijih arbovirusa, sa prosečnom nukleotidnom razlikom od 20, 22, i 31%, u okviru S-, L-, i M-segmenata. Evolucioni mehanizmi odgovorni za ovako visoku varijabilnost virusa su genetički drift, rekombinacija i resortiranje genomskih segmenata. Cilj ove studije je rekonstrukcija evolucionog porekla i filogeografska analiza VKKHG.

METODE: Analiza je obuhvatila 76 kompletnih kodirajućih sekvenci S gena VKKHG (1956-2014) dostupnih u NCBI bazi podataka. Prisustvo filogenetskog signala u poravnanim sekvencama je ispitano primenom TREE-PUZZLE programa, dok je temporalna struktura ispitivanog seta sekvenci analizirana pomoću programa Path-O-Gen. Rekonstrukcija evolucionog porekla, kao i filogeografska analiza virusa rađena je primenom BEAST 1.8 softverskog paketa.

REZULTATI: Osnovna topologija dobijenog filogenetskog stabla potvrdila je postojanje šest grupa koje su ranije definisane (Srednji istok, Zapadna Afrika 1, Južna i zapadna Afrika 2, Evropa i Turska, Kongo i Senegal, Grčka). Rezultati analize evolucionog porekla pokazali su da najraniji zajednički predak za S segment VKKHG datira od pre 1460 godina (95% HPD 615 – 2568), ali je analiza temporalne strukture postojećih molekularnih podataka dala negativan koeficijent korelacije

($R=-0,139$). Filogeografska analiza je kao mesto porekla VKKHG pokazala Zapadnu Afriku, odakle se virus dalje proširio ka drugim afričkim zemljama, Evropi i Aziji.

ZAKLJUČAK: Naši rezultati, dobijeni na najvećem broju do sada analiziranih kompletnih S genskih segmenata, potvrđuju ranije opisano filogenetsko grupisanje VKKHG u 6 glavnih grupa. Filogeografska analiza ukazuje da virus najverovatnije potiče iz zapadne Afrike, odakle je usledilo njegovo dalje širenje ka drugim afričkim zemljama, Evropi i Aziji.

Ključne reči: Virus Krimske-Kongo hemoragične groznice, najraniji zajednički predak, filogeografija

VARIJABILNOST INFLUENZA A VIRUSA - UZROCI I POSLEDICE

Prof. dr Vesna Milošević, mr. Jelena Radovanov

Institut za javno zdravlje Vojvodine, Centar za virusologiju, Futoška 121, Novi Sad

Influenca A viruse odlikuje izrazita genetička varijabilnost, koja je posledica kontinuiranih mutacija gena i povremenih genskih rearanžmana. Visoka stopa mutacija je uslovljena specifičnošću RNK-zavisne RNK polimeraze koja ne poseduje mehanizme provere i reparacije grešaka nastalih tokom replikacije genoma influenza A virusa. Postepenom akumulacijom mutacija gena koji kodiraju površinske glikoproteine, hemaglutinin i neuraminidazu, može doći do antigenetskog drifta, tj. pojave antigeniski izmenjene varijante postojećeg podtipa virusa.

Gensko rearanžiranje je proces u kojem dolazi do razmene segmenata genoma između dva virusa koji inficiraju istu ćeliju. Ukoliko se odvija između humanog i animalnog influenza A virusa, može dovesti do antigenetskog šifta, odnosno nastanka potpuno novog podtipa humanog virusa koji nosi površinske glikoproteine animalnog porekla. Genetička heterogenost populacija influenza A virusa u kombinaciji sa imunim sistemom domaćina, kao glavnim faktorom selekcije, uslovljavaju veoma brzu evoluciju ovih virusa.

Genetička varijabilnost je razlog mnogih specifičnosti influenza A virusa. Ona uslovljava postojanje velikog broja antigeniski različitih podtipova, koji nastaju rearanžmanima gena, kao i varijanti u okviru svakog podtipa koje nastaju mutacijama. Antigeniski šift je uslov pojave pandemija, a antigeniski drift sezonskih epidemija influence. Genetička promenljivost influenza A virusa dovodi do varijacija u virulenciji različitih sojeva istog podtipa i omogućuje promenu specifičnosti prema domaćinu.

Kontinuirani antigeniski drift, kao i pojava sojeva, koji su zahvaljujući nepredvidivim spontanim mutacijama u različitim regionima genoma, izgubili sposobnost umnožavanja u embrionisanim kokošjim jajima, ili ih je nemoguće antigeniski okarakterisati, čine proizvodnju vakcine protiv gripa pravim izazovom. Poseban problem predstavljaju mutirane varijante virusa, rezistentne na antivirusne. Uprkos tome što influenza A virusi

pretstavljaju predmet intenzivnog istraživanja još od 30-tih godina prošlog veka, genetičke osnove mnogih njihovih karakteristika i dalje su nejasne. Njihova nepredvidiva evolucija nameće potrebu kontinuiranog praćenja i izučavanja u cilju boljeg razumevanja različitih svojstava, kao i unapređenja mera prevencije i terapije influenza virusnih infekcija.

FORENZIČKO ISTRAŽIVANJE SLUČAJA TRANSMISIJE VIRUSA HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE FILOGENETSKIM PRISTUPOM

Marina Siljic¹, Dubravka Salemovic², Valentina Nikolic¹, Djordje Jevtovic², Ivana Pesic-Pavlovic³, Jovan Ranin², Marija Todorović, Maja Stanojevic¹

¹Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

²Klinika za infektivne i tropske bolesti KCS, Centar za HIV/AIDS, Beograd, Srbija

³Služba za mikrobiologiju KCS, Beograd, Srbija

CILJEVI: Filogenetska analiza pruža uvid u evoluciju, svojstva i dinamiku transmisije infektivnih agenasa, što je ključno u prevenciji i kontroli oboljenja koje izazivaju. U svetu se poslednjih decenija rezultati filogenetske analize koriste i kao važan deo forenzičkih istraživanja u kriminalistici, u slučajevima transmisije virusa, prevashodno virusa humane imunodeficijencije (HIV) i virusa hepatitisa C (HCV). Na iskustvima vodećih laboratorija u datoj oblasti formulisane su preporuke za forenzičku primenu filogenetske analize. Prikazani su rezultati filogenetske analize kao dela forenzičkog istraživanja slučaja transmisije HIV-a između tri pacijenta dijagnostikovanih 2011. godine.

METODE: Filogenetskim pristupom analizirane su virusne sekvence izolovane iz tri pacijenta uključena u forenzičko istraživanje kao i 38 lokalnih kontrolnih sekvenci. Metodom najveće verovatnoće i Bajesove statistike izračunata je genetička distanca i konstruisana su filogenetska stabla za sekvence dva virusna gena: pol i env. Višestruka trostruka serijska razblaženja izolovane DNK kao i cDNK kao i mnogostruko PCR umnožavanje najvećeg razblaženja urađeno je u cilju istraživanja smera transmisije.

REZULTATI: Filogenetskom analizom identifikovan je jedan transmisioni lanac, sa visokom statističkom podrškom kao i posteriornom vrednošću Bajesove statistike, sačinjen isključivo od virusnih sekvenci izolovanih iz tri pacijenata uključenih u forenzičko istraživanje. Mala genetička distanca između tri virusne sekvence transmisionog klastera ($gd < 1.5\%$) kao i izostanak mešanja lokalnih virusnih sekvenci i najbližijih sekvenci sa njima ukazuje na zajedničko poreklo i visok stepan genetičke sličnosti među njima.

ZAKLJUČAK: Rezultati naše filogenetske analize pokazuju značajnu sličnost virusnih sojeva izolovanih iz tri ispitavana pacijenta, što može da uputi na njihovu epidemiološku povezanost. U interpretaciji dobijenih rezultata važno je imati na umu mogućnosti i ograničenja forenzičke primene filogenetske analize, naročito u vezi smera transmisije. Filogenetski rezultati se moraju koristiti samo u kontekstu ostalih dostupnih podataka, naročito epidemioloških i kliničkih, u analizi slučajeva transmisije virusa.

Ključne reči: virus humane imunodeficijencije, filogenetska analiza, forenzička istraživanja

VIRUSI U VODI - METODOLOGIJA, IZAZOVI I ZNAČAJ

Vesna Milošević, Aleksandra Jovanović Galović
Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, Srbija

U površinskoj vodi kontaminiranoj fekalnim zagadjenjem može da se nadje preko 100 vrsta virusa koji prouzrokuju širok spektar bolesti kod čoveka - hepatitis, gastroenteritis, meningitis, groznicu, osipe, konjuktivitis, a prema novijim podacima i miokarditis i dijabetes. Među njima su najznačajniji svakako enterovirusi (poliovirus, Coxsackie A i B, ehovirus), rotavirusi, adenovirusi, norovirusi I i II, kao i virusi hepatitisa A i E. Broj virusnih epidemija povezanih sa pijaćom i rekreativnom vodom je često podcenjen, jer se pretpostavlja da je veliki procenat epidemija nepoznate etiologije zapravo virusnog porekla.

U Srbiji ima veoma malo podataka o prisustvu virusa u vodi. Voda za piće, površinske i vode za rekreaciju se mikrobiološki kontrolišu pre svega odredjivanjem bakterioloških parametara. Opterećenost virusima je nedovoljno poznato, ali se može pretpostaviti da je značajno s obzirom na odsustvo prečistača otpadnih voda u mnogim urbanim sredinama, kao i nepotpunu kanalizacionu mrežu. Virusi u životnoj sredini preživljavaju duže od enterobakterija - u slatkoj vodi do 120 a u zemljištu do 100 dana. Uz to, mnogi virusi su otporni na delovanje hemikalija (hlor) i UV zračenja, a njihove infektivne doze izuzetno niske (10-100 viriona). U literaturi su zabeležene virusne epidemije prourokovane pijaćom vodom koja je zadovoljavala bakteriološke standarde. Postalo je jasno da su bakteriološki pokazatelji fekalnog zagadjenja nedovoljni da bi se u potpunosti sagledala zdravstvena bezbednost kako vode za piće, tako i vode za rekreaciju.

Uvodjenje adekvatnih, senzitivnih metoda za odredjivanje virusa u vodenj sredini je veoma značajno sa aspekta zaštite javnog zdravlja. Iskustva koja ima Centar za virusologiju, Instituta za javno zdravlje Vojvodine u vezi izbora adekvatne metodologije, mogućnosti uvođenja virusnog indikatora fekalnog zagadjenja, kao i prvi rezultati na ovom polju na području Vojvodine, će biti izloženi.

Ključne reči: enterovirusi, nanokeramički filtri, real-time PCR

INVAZIVNA LISTERIOZA – PRIKAZ SLUČAJA

Milena Branković¹, Dubravka Papić Damjanović¹, Jelena Lekić²
Mikrobiološka laboratorija, Opšta bolnica¹, Užice, Srbija
Zavod za javno zdravlje², Užice, Srbija

UVOD: Listerioza je bolest izazvana bakterijom *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*). Kod zdrave odrasle populacije manifestuje se kao blag oblik gripa, sa ili bez gastroenteritisa. Teška klinička slika se javlja kod trudnica, neonatusa, starijih i osoba sa oštećenim ćelijskim imunim odgovorom, a ispoljava se u vidu materno-fetalne ili neonatalne bolesti, sepsa i meningoencefalitisa.

PRIKAZ SLUČAJA: Pacijentkinja, stara 79 godina, primljena je na odeljenje neurologije OB Užice zbog naglog razvijanja oduzetosti desne ruke, kao i nemogućnosti govora. Prethodnih 17 dana je lečena na Internom odeljenju bolnice u Požegi, gde je primala vazodilatatorne koktele. Na prijemu je urađen MSCT endokranijuma na kome se uočavaju promene koje odgovaraju ishemijskom infarktu mozga. Dan po prijemu pacijentkinja postaje febrilna. U krvnoj slici nađena je leukocitoza sa granulocitozom. Uzeta je hemokultura i inkubirana u aparatu BACTEC 9050. U kultivaciji, identifikaciji i izradi antibiograma primenjene su standardne laboratorijske tehnike. Identifikacija *L.monocytogenes* potvrđena je primenom testa api® *Listeria* (Biomérieux). U terapiju su uključeni amoksicilin i gentamicin. Zbog razvoja akutne bubrežne insuficijencije, gentamicin je zamenjen levofloksacinom. Antimikrobna terapija primenjivana je 15 dana. Pacijentkinja je sa posledicama neurološkog oštećenja prevedena na odeljenje rehabilitacije, a zatim u ustanovu kolektivnog smeštaja.

ZAKLJUČAK: Pošto se bolest javila kod pacijentkinje koja je prethodnih 17 dana provela u bolnici verovatno je reč o intrahospitalnoj infekciji. Obzirom na široku rasprostranjenost *L.monocytogenes* u prirodi i visoku smrtnost od invazivne listerioze (20-30%) osoba koje su u riziku, one ne bi trebalo da jedu nedovoljno termički obrađenu hranu životinjskog porekla i neoprano povrće. Kod pojave simptoma bolesti kod ovakvih pacijenata trebalo bi misliti na listeriozu i u terapiju uključiti kombinaciju ampicilin-gentamicin, budući da je ova bakterija urođeno rezistentna na cefalosporine.

Ključne reči: *Listeria monocytogenes*, sepsa, bolnička infekcija

CLOSTRIDIUM DIFFICILE U DVE ZDRAVSTVENE USTANOVE U BEOGRADU: REZULTATI PCR RIBOTIPIZACIJE

M. Jovanović¹, M. Rupnik², T. Tošić¹, S. Jovanović¹, B. Stošović¹, Z. Stojanović
Varagić¹, M. Drakulović³, S. Janežič²

¹Služba za mikrobiologiju, Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija

²National Laboratory for Health, Environment and Food, Maribor, Slovenia

³Institut za zaštitu zdravlja Milan Jovanović Batut, Beograd, Srbija

Clostridium difficile (CD) je važan izazivač infekcija kao što su nozokomijalna diareja, pseudomembranozni kolitis i toksični megakolon. Broj infekcija izazvanih ovim mikroorganizmom je u porastu od 2003. godine u SAD, Kanadi i evropskim zemljama. I u našoj zemlji se od pre više od 5 godina sve učestalije javljaju infekcija koje izaziva CD. Ispitali smo ribotipove CD izolovanih iz stolica pacijenata koji su bili hospitalizovani u dve zdravstvene ustanove u Beogradu: Kliničkom centru Srbije i specijalnoj bolnici Sveti Sava.

Istraživanje se odnosi na podatke iz Bakteriološke laboratorije pri Klinici za infektivne i tropske bolesti, Služba za mikrobiologiju Kliničkog centra Srbije, u periodu od januara 2009. do decembra 2013. godine. U ovoj laboratoriji se obrađuju stolice pacijenata iz celog Kliničkog centra Srbije i specijalne bolnice Sveti Sava za koje se sumnja na infekciju izazvanom CD. Stolice su zasejavane na CLO agar i kultivisane su u anaerobnim uslovima i/ili je u njima ispitivano prisustvo toksina A i/ili B imunohromatografskim testom. Za PCR ribotipizaciju je odabrano 97 sojeva od 95 pacijenata hospitalizovanih od novembra 2011. do maja 2013. godine.

Od 6164 uzorka stolice koji su obrađeni u Bakteriološkoj laboratoriji u petogodišnjem periodu u 1738 (28.2%) je dokazan CD, sa linearnim trendom rasta. Od 97 izolata većina (85; 87.6%) su pripadali PCR ribotipu 027. Preostalih 12 sojeva bilo je PCR ribotipa 014/020 (3 izolata); 015, SLO191 (po 2 izolata), 017, 018, 070, 001/072, i SLO108 (po 1 izolat).

Istraživanje pokazuje da su infekcije koje izaziva CD ozbiljan problem u dve zdravstvene ustanove u Beogradu i da je PCR ribotip 027 prisutan kao predominantan izazivač infekcija ovim mikroorganizmom bar od 2011. godine.

**ZASTUPLJENOST MULTIREZISTENTNOG PSEUDOMONAS
AERUGINOSA I FENOTIPSKA DETEKCIJA
METALOBETALAKTAMAZA KOD BOLNIČKIH IZOLATA U
KLINIČKOM CENTRU NIŠ U PERIODU 2011-2014. GODINE**

Snežana Mladenović-Antić, B.Kocić*, M.Dinić*, G.Randjelović*, P.Stojanović*
Institut za javno zdravlje Niš, Medicinski fakultet Niš, Niš, Srbija

CILJ RADA: Ispitivanje učestalosti pojave multirezistentnih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i fenotipska detekcija metalobetalaktamaza u četvorogodišnjem periodu u Kliničkom centru Niš.

MATERIJAL: Ispitivanjem je obuhvaćeno 1097 izolata *Pseudomonas aeruginosa* iz različitih kliničkih materijala, uzetih od pacijenata hospitalizovanih u Kliničkom centru Niš tokom 2011-2015. godine i obradjenog u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje u Nišu.

METODE: Izolacija i identifikacija vršena je standardnim bakteriološkim metodama. Osetljivost na antibiotike određivana je disk-difuzionom metodom po Kirby-Baueru, tabletama Rosco Diagnostica. Kod 50 multirezistentnih izolata urađen je fenotipski test detekcije metalobetalaktamaza diskovima imipenema i imipenem + EDTA i MIC trakama sa istom kombinacijom antibiotika. Izbor antibiotika izvršen je prema CLSI-u (Institut za kliničke i laboratorijske standarde) 2011-2014., sa kontrolnim sojem *E.coli* ATCC 2922 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

REZULTATI: Obradjeno je 1097 izolata *Pseudomonas aeruginosa*. Ispitivanje osetljivosti *Pseudomonas aeruginosa* na izabrane antibiotike dalo je sledeće podatke: procentualna zastupljenost izolata rezistentnih na piperacilin-tazobaktam bila je u periodu od 2011-2015. godine sledeća (datim redom): 25%, 27%, 17%, 14%. Za ceftazidim: 26%, 29%, 23%, 29%; za cefepim: 36%, 30%, 27%, 41%; za gentamicin: 45%, 48%, 42%, 47%; za amikacin: 37%, 36%, 32%, 38%; za ciprofloksacin: 42%, 44%, 34%, 39%; za imipenem: 19%, 28%, 22%, 25%; za meropenem: 18%, 30%, 22%, 30%. Multirezistentnih izolata bilo je 29,3%, 35,9%, 25,3%, 34,7%, 27,9%. Ispitivanje osetljivosti multirezistentnih izolata na izabrane antibiotike dalo je sledeće podatke: procentualna zastupljenost

izolata rezistentnih na piperacilin-tazobaktam bila je u periodu od 2011-2015. godine sledeća (datim redom): 49%, 51%, 53%, 32%. Za ceftazidim: 57%, 61%, 66%, 56%; za cefepim: 68%, 57%, 88%, 79%; za gentamicin: 84%, 83%, 82%, 78%; za amikacin: 73%, 69%, 73%, 58%; za ciprofloksacin 62%, 82%, 75%, 74%; za imipenem 62%, 73%, 73%, 68%; za meropenem 59%, 78%, 77%, 67%.

ZAKLJUČAK: Multirezistentni *Pseudomonas aeruginosa* zastupljen je sa 31,45% u periodu 2011-2014.godine. Od testiranih 50 MDR izolata, 43 su potencijalni produktori metalobeta laktamaza.

Ključne reči: *Pseudomonas aeruginosa*, multirezistencija, fenotipska detekcija metalobetalaktamaza

UTICAJ ANTIBIOTIKA NA ADHERENCIJU, HIDROFOBNOŠĆ I PRODUKCIJU BIOFILMA INVAZIVNIH I NEINVAZIVNIH IZOLATA *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Aleksandra Šmitran¹, Ljiljana Božić¹, Nataša Vučković Opavski², Ina Gajić², Lazar Ranin²

¹Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Banja Luka, Republika Srpska

²Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

CILJEVI: Produkcija biofilma *Streptococcus pyogenes* je još uvijek nedovoljno istražen faktor virulencije koji je, uz intracelularno preživljavanje ove bakterije, najvjerovatnije zaslužan za nastanak streptokoknog kliconoštva. Cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju, hidrofobnost i produkciju biofilma kod invazivnih i neinvazivnih izolata *Streptococcus pyogenes*.

METODE: Ispitivani izolati su dio kolekcije sojeva Nacionalne referentne laboratorije za streptokok na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Univerziteta u Beogradu. Ukupno je ispitano 172 izolata koji su podijeljeni u tri grupe: 100 neinvazivnih izolata dobijenih iz brisa grla asimptomatskih kliconoša, 50 slabo invazivni izolati dobijeni iz brisa grla pacijenata sa streptokoknim tonzilofaringitisom i 22 invazivna izolata iz krvi pacijenata sa STSS ili nekrotišućim fasciitisom. Adherencija za neobloženu mikrotitarsku ploču i produkcija biofilma su ispitani metodom po Stepanovicu i sar. prije i nakon inkubacije sa subinhibitornim koncentracijama penicilina, eritromicina i klindamicina. Hidrofobnost je ispitivana metodom po Rosenbergu i sar. prije i nakon inkubacije sa subinhibitornim koncentracijama penicilina, eritromicina i klindamicina.

REZULTATI: Kod izolata netretiranih antibiotikom invazivni izolati su pokazali i slabiju hidrofobnost ($p=0,041$) i slabiju produkciju biofilma ($p=0,04$) u odnosu na slabo invazivne i neinvazivne izolate. Slaboinvazivni izolati su pokazali statistički značajnu slabiju adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču u odnosu na druge dvije grupe sojeva ($p<0,001$, $p=0,017$). Nakon inkubacije sa penicilinom neinvazivni izolati su pokazali bolju adherenciju ($p=0,045$), veću hidrofobnost ($p<0,001$, $p=0,015$) i bolju produkciju biofilma ($p<0,001$, $p=0,007$) u odnosu na

invazivne grupe izolata. Nakon tretmana sa eritromicinom invazivni izolati su pokazali bolju adherenciju ($p=0,021$) i produkciju biofilma ($p<0,001$, $p=0,002$) u odnosu na neinvazivne i slabo invazivne izolate. Nakon inkubacije sa klindamicinom nisu uočene razlike između ispitivanih grupa u produkciji biofilma ($p>0,05$).

ZAKLJUČAK: Produkcija biofilma u uslovima terapijske subdoziranosti penicilinom, vjerovatno, doprinosi nastanku streptokoknog kliconoštva.

Ključne riječi: *Streptococcus pyogenes*, antibiotici, biofilm

**ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI
BAKTERIOCINA LICHENIOCIN 50.2 I BAKTERIOCINA SOJA
LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS BIOVAR.
DIACETYLLACTIS BGBU1-4 NA KLINIČKE IZOLATE LISTERIA
MONOCYTOGENES**

Veselin Draganić¹, Ivana Ćirković², Dragana Božić³, Jelena Lozo^{4,5}, Tanja Berić⁴,
Biljana Arsić¹, Eliana Garalejić¹, Slobodanka Đukić², Slaviša Stanković⁴

¹Ginekološko akušerska klinika „Narodni front“, Beograd

²Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
Beograd

³Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

⁴Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

⁵Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

UVOD: Bakteriocini su peptidni ili proteinski molekuli koji se ribozomalno sintetišu i ispoljavaju svoj antimikrobni potencijal prema određenim vrstama mikroorganizama, a prema kojima soj proizvođač ima specifičan mehanizam samozaštite. Sve rašireniji problem rezistencije bakterija na postojeće antibiotike, posebno kliničkih izolata povećao je interesovanje za primenu bakteriocina kao jednog od alternativnih rešenja.

CILJEVI: Ispitivanje antibakterijskog efekta novih bakteriocina, licheniocina 50.2 i bacteriocina soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, na kliničke izolate soja *Listeria monocytogenes*.

METODE: Izolovanje bakteriocina izvršeno je iz supernatanta prekonoćnih bakterijskih kultura *Bacillus licheniformis* VPS50.2 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 precipitacijom amonijum sulfatom. U istraživanje je bio uključen 21 izolat *L. monocytogenes*: 20 kliničkih izolata izolovanih iz vaginalnih briseva pacijentkinja na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u periodu od 1993.-2003. godine i jedan referentni soj *L. monocytogenes* ATCC 19111. Klinički izolati *L. monocytogenes* su identifikovani primenom standardnih mikrobioloških metoda.. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti odabranih bakteriocina vršeno je dilucionim metodom u mikrotitracionim pločama.

REZULTATI: Bakteriocin licheniocin 50.2 i bacteriocini soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 su pokazali antibakterijski efekat na 13 (61,9%) sojeva *L. monocytogenes* (12 kliničkih izolata i referentni soj ATCC 19111). Minimalne inhibitorne koncentracije bakteriocina licheniocin 50.2 su iznosile: kod referentnog i jednog kliničkog soja (8,4%) 50 AU/ml, a kod 11 sojeva (91,6%) 25 AU/ml, dok su za bacteriocine soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 iznosile: kod referentnog i dva klinička (16,7%) soja 3,12 AU/ml, a kod 10 sojeva (83,3%) 6,25 AU/ml.

ZAKLJUČAK: Rezultati naše studije su pokazali da bakteriocin licheniocin 50.2 i bacteriocini soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 ispoljavaju inhibitorno dejstvo na 61,9% testiranih sojeva *L. monocytogenes*. Bacteriocini soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 su pokazali antibakterijski inhibitorni efekat u nižoj koncentraciji u odnosu na bakteriocin licheniocin 50.2.

PRIMENA STANDARDA ZA KONTROLU PODLOGA EN ISO 11133:2014 U AKREDITOVANIM LABORATORIJAMA ZA ISPITIVANJE HRANE I VODE

Dr Svetlana Raketić, Dr Danka Jovanović
Zavod za javno zdravlje Čačak

Visok kvalitet hranljivih podloga je od osnovnog značaja za mikrobiološko ispitivanje uzoraka hrane i vode. Bez podloga visokog kvaliteta, mogućnost dobijanja tačnih, reproducibilnih i ponovljivih rezultata je značajno redukovana.

ISO je u maju 2014 godine izdao novi, revidirani standard, ISO 11133:2014, koji je zamenio prethodna dva dela, ISO/TS 11133-1:2009 i ISO/TS 11133-2:2003/Amd.1:2011 i postao obavezni standard za proizvođače podloga i sve akreditovane laboratorije.

Cilj rada je da se istaknu najznačajnije izmene standarda koje zahtevaju posebnu pažnju i angažovanje laboratorija, u smislu ispunjavanja zahteva standarda.

U toku revizije standard je kompletno rekonstruisan, detaljno su opisane procedure proizvodnje i kontrole karaktristika podloga i jasno razgraničene odgovornosti proizvođača podloga i laboratorija koje ih koriste. Laboratorije koje same proizvode svoje podloge, moraju testirati svaku seriju proizvedenih podloga, i to pomoću najmanje jednog soja navedenog u standardu, koji je obeležen oznakom „b“ (Aneks E i F). Proizvođači, sa druge strane, moraju sprovesti rigorozno kvalitativno i/ ili kvantitativno testiranje na svim, sa ISO 11133: 2014 usaglašenim hranljivim podlogama, koje isporučuju laboratorijama. Laboratorija koja kupuje dehidrirane ili gotove podloge od proizvođača, može osigurati da su podloge proizvedene i sertifikovane u skladu sa EN ISO 11133: 2014, nabavkom sertifikata za kontrolu kvaliteta kao pratećeg dokumenta. Standard ima prošireno područje primene i odnosi se i na podloge koje se koriste u ISO metodama za ispitivanje voda.

Novi zahtev koje laboratorije moraju ispuniti je određivanje roka trajanja podloga. Rok trajanja podloga se uspostavlja proverom osnovnih fizičkih,

hemijskih i mikrobioloških karakteristika podloga nakon isteka predviđenog vremena čuvanja.

Standard zahteva od laboratorija statističku analizu dobijenih vrednosti indeksa produktivnosti sa konstrukcijom kontrolnih karti. Svaka laboratorija treba da odredi sopstvene granice, tj. postavi limite za prihvatljive vrednosti produktivnosti za svaki ispitivani agar unutar dozvoljenih vrednosti produktivnosti, a zatim ih koristi za praćenje produktivnosti sledećih serija.

Implementacija zahteva standarda EN ISO 11133: 2014 i uvođenje dodatnih mera kontrole podloga, kako na nivou proizvođača i distributera, tako i na nivou laboratorije korisnika, značajno će se poboljšati kvalitet mikrobiološkog ispitivanja, tačnost i preciznost rezultata, smanjiti mikrobiološke javnozdravstvene rizike i povećati bezbednost potrošača.

Ključne reči: ISO 11133:2014, hranljive podloge, karakteristike podloga

KOMPARATIVNA ANALIZA DISK DIFUZIONOG METODA I E-TESTA U ISPITIVANJU OSETLJIVOSTI MULTIREZISTENTNIH SOJEVA BAKTERIJA RODA ACINETOBACTER NA TIGECIKLIN

Boris Jegorović¹, Dušan Kekić¹, Maja Travar², Snežana Jovanović³, Lazar Ranin¹

¹ Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

² Klinički centar Banjaluka, Republika Srpska

³ Laboratorijski odsek za bakteriologiju i mikologiju, Služba za mikrobiologiju, Klinički centar Srbije, Beograd

Uvod: Bakterije roda *Acinetobacter* su među vodećim bolničkim patogenima. Izazivaju izuzetno teške infekcije, najčešće kod pacijenata u jedinicama intenzivne nege, a rezistentni su na skoro sve dostupne antibiotike. Tigeciklin je antibiotik iz grupe glicilciklina, koji pokazuje dobru aktivnost i na multirezistentne bakterije. Međutim, u vodičima za ispitivanje antimikrobne osetljivosti nema definisanih graničnih vrednosti za kategorizaciju osetljivosti *Acinetobacter spp.* na tigecklin, što otežava interpretaciju rezultata.

Cilj ovog rada je bio da se evaluiraju rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Acinetobacter spp.* na tigeciklin, disk difuzionom metodom i E testom, kao i da se utvrdi kakva je korelacija između dobijenih rezultata.

Materijal i metode: Ispitana je osetljivost 69 izolata *Acinetobacter spp.*, od kojih je 32 bilo identifikovano do nivoa vrste – *A.baumannii*. Sojevi su u periodu januar-mart 2015. godine izolovani iz krvi, sputuma, bioptata tkiva, briseva rana, trahealnih aspirata i sa vrhova centralnih venskih katetera u četiri mikrobiološke laboratorije pri tercijarnim zdravstvenim ustanovama u Beogradu i Banja Luci. Identifikacija je urađena komercijalnim sistemima – BBL CrystalID i VITEK. Osetljivost na tigeciklin je ispitana disk-difuzionom metodom (tigecklin, 15 µg, BioRad) i određivanjem vrednosti MIK, pomoću MIC test stripa (Liofilchem). Obrada dobijenih podataka vršena je pomoću Microsoft Excel i IBM SPSS programskih paketa.

Rezultati: Vrednosti MIK tigeciklina su bile u rangi od 0,125 µg/ml do 12 µg/ml, dok je vrednost zone inhibicije rasta bila u rasponu od 10 mm do

24 mm. Visoko je statistički značajno ($p < 0,01$) da je najveći broj izolata (35,71%) imao vrednost MIK 1,5 µg/ml, što je ujedno i MIK₅₀. MIK₉₀ je 3 µg/ml. Pokazana je visoko statistički značajna povezanost ($p < 0,01$) između dijametra zone inhibicije rasta, izražene u mm, i vrednosti MIK.

Zaključak: Vrednost dijametra zone inhibicije rasta u disk difuzionom testu dobro korelira sa vrednostima MIK, što ukazuje i na mogućnost interpretacije vrednosti MIK na osnovu poznavanja zone inhibicije rasta, korišćenjem odgovarajućeg dijagrama korelacije.

Ključne reči: Tigeciklin, *Acinetobacter*, Gram negativne nefermentujuće bakterije, disk difuzija, MIK, osetljivost

OSETLJIVOST GRUPE B STREPTOKOKA NA ANTIBIOTIKE U TROGODIŠNJEM PERIODU (2010-2014.) U BEOGRADU

Dušan Kekić¹, Boris Jegorović¹, Ina Gajić¹, Nataša Opavski¹, Marina Stojković²,
Snežana Tomanović³, Slobodanka Stefanović³, Lazar Ranin¹

¹ Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

² Služba za mikrobiologiju, GAK Narodni front, Beograd

³ Služba za mikrobiologiju, Kliničkog centra Srbije

UVOD: *Streptococcus agalactiae* - grupa B streptokoka (GBS) je jedan od najznačajnijih uzročnika neonatalnog morbiditeta i mortaliteta. Poslednjih godina je, međutim, uočeno da podjednako često izaziva i infekcije rana i sepsu kod starijih i imunokompromitovanih pacijenata. Dodatni problem predstavlja sve raširenija rezistencija GBS na makrolide.

CILJ ovog rada je ispitivanje osetljivosti invazivnih i neinvazivnih sojeva GBS na antibiotike, kao i i određivanje fenotipova rezistencije na makrolide.

MATERIJAL METODE: Ispitana je osetljivost 138 izolata GBS, od čega 28 invazivnih, a 110 neinvazivnih. Sojevi su izolovani u 8 mikrobioloških laboratorija u Beogradu, u periodu od 2010. do 2014. godine i poslani u Referentnu laboratoriju za streptokok. Osetljivost na antibiotike je ispitana disk difuzionom metodom, prema preporukama CLSI, a fenotipovi rezistencije na makrolide su određeni dvostrukim disk difuzionim testom.

REZULTATI: Svi sojevi su bili osetljivi na penicilin, norfloksacin i vankomicin. Rezistencija na eritromicin je registrovana kod 38,4% izolata. Međutim, neinvazivni izolati su bili statistički značajno više rezistentni ($p < 0,05$) na makrolide od invazivnih – rezistencija je nađena kod 42,73% neinvazivnih sojeva i 21,43% invazivnih. Zapaženo je i da je preko 95% sojeva rezistentnih na eritromicin bilo istovremeno rezistentno i na tetracikline. Najveći broj izolata (86,8%) je eksprimirao MLS fenotip, koji se karakteriše udruženom i visokom rezistencijom na makrolide, linkozamide i streptogramine, dok je svega 13,2% bilo rezistentno samo na makrolide (M fenotip).

ZAKLJUČAK: Penicilin i drugi beta laktamski antibiotici se mogu i dalje smatrati prvom linijom izbora za lečenje infekcija izazvanih *S.agalactiae*. Međutim, zbog izražene rezistencije naših izolata na makrolide, ne preporučuje se njihova empirijska upotreba za tretman infekcija izazvanih GBS. Kontinuirano praćenje osetljivosti GBS na antibiotike je neophodno, kako bi se pratili trendovi rezistencije ove vrste i, u skladu sa tim, menjale preporuke za lečenje.

Ključne reči: *Streptococcus agalactiae*, grupa B streptokoka, rezistencija, antibiotici

**PROTOKOL UZIMANJA I OBRADE UZORAKA
DERMATOLOŠKIH PACIJENATA U MIKROBIOLOSKOJ
LABORATORIJI JZU „SVETI VRACEVI“ BIJELJINA**

Jelena Nastasić-Femić
JZU "Sveti Vračevi" Bijeljina, Republika Srpska, BiH

Posle pregleda kod dermatologa pacijenti sa promjenama na koži, noktima ili kapilicijumu dolaze u laboratoriju da bi zakazali pregled i dobili uputstvo za pripremu. Na propratnoj uputnice obavezno pise da se traži pregled uzorka promjene na bakterije, gljivice i dermatofite.

Prije dolaska pacijenta u zakazano vrijeme temperiraju se podloge i pripremi set za uzimanje uzorka. Standardne podloge na koje se zasijavaju uzorci su: Krvni agar, Endo agar, Sabouraud dextrose agar i Dermatophyte (DTM) agar razliveni u petrijeve ploce. Set za uzimanje uzoraka cine sterilni: hirurške kirete (promjer kirete 5mm), lancete, makazice, pincete, brisevi (obicani i tanji). Promjene na koži i kapilicijumu se uzimaju kiretom i direktno ubodom zasijavaju na podloge, najmanje 20 uboda. Porast u ubodnim zarezima isključuje mogućnost kontaminacije. Kolonije su pravilno formirane i omogućavaju lagan pristup prilikom pravljenja mikroskopskih preparata. Uzorci sa noktiju i ispod noktiju se uzimaju lancetom struganjem direktno na podlogu, s tim da se površinski i ivični sloj nokta prethodno odstrani i neupotrebljava. Po potrebi se koristi ostali pribor.

Zasijane podloge se oblijepe širokom selotejp trakom, na jednom kraju se ubodom napravi otvor i inkubiraju: KA, EA i SAB na 36,5⁰C 24 sata, a DTM na 27, 5⁰C. Posle 24 sata pregledaju se KA i EA a SAB se prebacuje u inkubator na 27,5⁰C. Porasle bakterije na KA i EA se dalje obrađuju prema sopstvenim protokolima i izdaju nalazi sa naznakom da su gljivice i dermatofiti u daljem radu. SAB i DTM se pregledaju tri puta sedmično do porasta i mogućnosti indentifikacije. Nalaz se izdaje najdalje do 28 dana

Mikroskopski preparati za dermatofite i gljivice se prave po metodi cellophane tape mount. Koriste se i dostupne biohemijske reakcije i druge mikološke analize.

U 2014 godini pregledano je 308 pacijenata, 321 uzorak. Izolovano je: dermatofiti – 50 nalaza (samo izolovani dermatofiti – 27 nalaza, dermatofiti udruženi sa bakterijama ili/i gljivicama 23 nalaza); Bakterije i gljivice – 126 nalaza; samo gljivice - 60 nalaza; samo bakterije - 60 nalaza. Podloge su ostale sterilne kod 25 nalaza.

Ključne riječi: Mikrobiološka laboratorija, dermatološki pacijenti, protokol

BILJNI EKSTRAKTI: POTENCIJALNI PRIRODNI ANTIBAKTERIJSKI AGENSI

Olgica Stefanović, Katarina Mladenović, Mirjana Grujović, Braho Ličina, Ivana Radojević, Ljiljana Čomić
Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

Biljke proizvode čitav niz različitih jedinjenja, sekundarne metabolite, koja nemaju poseban značaj za primarni metabolizam biljaka, već predstavljaju adaptivnu sposobnost biljke na nepovoljne abiotičke i biotičke uslove životne sredine. Jedinjenja koja inhibitorno deluju na mikroorganizme obuhvaćeni su zajedničkim terminom fitoncidi ili fitoaleksini. Imajući u vidu dosadašnja saznanja o širenju rezistencije i otpornost sve većeg broja bakterija na tradicionalne antibiotike, bakterijska rezistencija postaje veliki zdravstveni problem. Jedan od pristupa u rešavanju ovog problema je ispitivanje biljnih ekstrakata kao potencijalnih novih izvora antibakterijskih agenasa. Ekstrakti predstavljaju proizvod ekstrakcije, postupak u kome se jedinjenja iz biljnih droga izdvajaju na osnovu različite rastvorljivosti. Prednost biljnih ekstrakata u primeni kao antibakterijski agensi ogleda se u širokom spektru delovanja i smanjenoj mogućnosti razvoja bakterijske rezistencije.

Iz tog razloga, cilj ovog rada je bio da se *in vitro* testira antibakterijska aktivnost ekstrakata pripremljenih od biljnog materijala prikupljenog na područja Srbije i proceni njihova uloga u sprečavanju rasta i razmnožavanja patogenih bakterija. Selekcija biljnih vrsta je izvršena prema njihovoj primeni u tradicionalnoj medicini i u radu je testirano 15 biljnih vrsta: *Melissa officinalis*, *Clinopodium vulgare*, *Teucrium chamaedrys*, *Teucrium montanum*, *Origanum vulgare*, *Sideritis montana*, *Xeranthemum anuum*, *Agrimonia eupatoria*, *Gentiana asclepiadea*, *Cytisus nigricans*, *Melilotus albus*, *Melilotus officinale*, *Cichorium intybus*, *Torilis anthriscus* i *Allium flavum*. Efekat etanolnih i metanolnih ekstrakata je praćen u odnosu na dve gram-pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) i dve gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Inhibitorni efekat je određen primenom mikrodilucione metode i prikazan minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK). U testiranim ekstraktima je

spektrofotometrijski izmerena koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida.

Testirani ekstrakti su pokazali antibakterijsku aktivnost u opsegu od 0,156 mg/ml do 20 mg/ml. Osetljivost gram-pozitivnih bakterija je značajnije bila veća od osetljivosti gram-negativnih bakterija. Rast bakterije *B. subtilis* je inhibiran u interval od 0,156 mg/ml do 20 mg/ml. Efekat na ovu bakteriju je pokazalo 12 testiranih biljaka. Bakterije *S. aureus* je pokazala osetljivost na 11 testiranih biljaka. MIK su bile u intervalu od 0,31 mg/ml do 20 mg/ml. Od gram-negativnih bakterija, bakterija *P. aeruginosa* je pokazala veću osetljivost od bakterije *E. coli*. Interval delovanja testiranih ekstrakata je bio 1,25 – 20 mg/ml u odnosu na *P. aeruginosa* i 5 – 20 mg/ml u odnosu na *E. coli*. Među testiranim biljkama kao najaktivnije su se izdvojile: *O. vulgare*, *A. flavum*, *A. eupatoria* i *S. montana*. Izmerene količine ukupnih fenola (12,75 – 159,84 mgGA/g) i flavonoida (8,22 – 159,54 mgRU/g) ukazuju da jedinjenja fenolnog tipa određuju antibakterijsku aktivnost biljnih ekstrakata.

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST METANOLNOG EKSTRAKTA GLJIVE *CORIOLUS VERSICOLOR* OBOGAĆENE ORGANSKIM I NEORGANSKIM IZVOROM SELENA

Dunja Duvnjak¹, Milena Pantić¹, Danka Matijašević¹, Ljubinko Jovanović², Ivana Vasiljević³, Milana Lazović³, Miomir Niksić¹

¹ Katedra za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

² Fakultet ekološke poljoprivrede, Educons Univerzitet, Sremska Kamenica, Srbija

³ A Bio Tech Lab laboratorija, Educons Univerzitet, Sremska Kamenica, Srbija

Coriolus versicolor je medicinska gljiva čija je lekovitost potvrđena brojnim istraživanjima. Biološki aktivni polisaharidi i polisaharo-peptidi izolovani iz micelije submerzno gajene *Coriolus versicolor* gljive se koriste u prevenciji mnogih bolesti. Ova gljiva se može gajiti i na čvrstom supstratu, na otpadu iz poljoprivrede i na taj način se može uspešno upotrebiti pri bioremedijaciji. Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi da li se antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta gljive *Coriolus versicolor* gajenjem na čvrstom supstratu obogaćenom selenom može povećati.

Kao supstrat za gajenje upotrebljena je mešavina slame, hrastove pljevine i pšeničnih mekinja. Za obogaćivanje supstrata korišćeni su organski i neorganski izvori selena: selesnki kvasac (Sel-Plex[®], Alltech Inc., Lexington, USA) i natrijum selenit, Na₂SeO₃ u koncentraciji od 25 mg/kg suvog supstrata. Kontrolni uzorak je pripremljen bez dodavanja selena. Nakon metanolne ekstrakcije, određen je sadržaj selena u digestovanim uzorcima upotrebom ICP-OES uređaja. Kod uzorka obogaćenih selenom iz neorganske soli sadržaj selena je bio 123,4 µg/g, a kod uzoraka obogaćenih selenom iz selenskog kvasca 62,4 µg/g suve mase uzorka.

Mikrodilucionom metodom ispitana je antimikrobna aktivnost dobijenih metanolnih ekstrakata na 15 sojeva bakterija i utvrđeno je da dodatak neorganske soli dovodi do povećanja antimikrobne aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak samo kod dve Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus spizizeni* ATCC 6633 gde je MIC < 0,3125 mg/ml i *Enerococcus faecalis* ATCC 29212, MIC = 40 mg/ml. Sa druge strane, ispitivanjem antimikrobnog delovanja ekstrakata dobijenih iz gljive obogaćene

selenom iz kvasca primećeno je izraženije mikrobistatično i mikrobicidno delovanje u poređenju i sa kontrolnim uzorkom i sa uzorkom kome je dodat Na_2SeO_3 kod skoro svih testiranih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Iako dobijeni rezultati ukazuju na to da je u ekstraktu gljive koja je rasla na supstratu sa selenskim kvascem detektovano duplo manje ukupnog seleno nego kod uzorka obogaćenog selenitom, antimikrobna aktivnost takvih uzoraka je bila znatno izraženija. Pretpostavlja se da je selen iz organskog izvora promenio hemijski sastav gljive.

Ključne reči: *Coriolus versicolor*, antibakterijska aktivnost, selen

GENETIČKI DIVERZITET SOJEVA *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *CORYLINA* I RAZVOJ MOLEKULARNIH MARKERA ZA BRZU IDENTIFIKACIJU PATOGENA

Andelka Prokić¹, Nemanja Kuzmanović¹, Milan Ivanović¹, Katarina Gašić², Nevena Zlatković¹, Maja Tolinački³, Nataša Golić³, Milan Kojić³, Aleksa Obradović¹

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija

³Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd, Srbija

U cilju razvoja specifičnih dijagnostičkih markera za molekularnu detekciju prouzrokača bakteriozne plamenjače leske, proučene su genetičke karakteristike i filogenetska srodnost 51 soja *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) različitog geografskog porekla.

Genetički diverzitet sojeva analiziran je primenom rep-PCR metode, korišćenjem BOX, ERIC i REP prajmera i makrorestrikcione PFGE analize korišćenjem *SpeI* restriktionog enzima. Taksonomska pozicija i filogenetska srodnost sojeva proučeni su analizom parcijalnih sekvenci 16S rRNK i *rpoD* gena. Specifični DNK fragmenti umnoženi ERIC-PCR metodom odabrani su za dizajniranje PCR prajmera.

Na osnovu rep-PCR i PFGE analize izvršena je diferencijacija sojeva i definisano 8 klonalnih genetičkih grupa. Na osnovu BLAST analize, utvrđen je visok stepen nukleotidne identičnosti (98-100%) parcijalne sekvence 16S rRNK gena soja KFB 275 poreklom iz Srbije i drugih *Xanthomonas* spp. sojeva dostupnih u banci gena, čime je izvršena identifikacija proučavanog soja do nivoa roda. Utvrđena je 100% identičnost analiziranih sekvenci *rpoD* gena međusobno, kao i sa sekvencama Xac sojeva dostupnim u bazi podataka. Izuzetak su predstavljala tri soja iz baze sa kojima je procenat identičnosti iznosio 99%. U PCR analizi, korišćenjem prajmera dizajniranih u ovom radu, postignuta je uspešna detekcija svih proučavanih *corylina* sojeva, ali i pojedinih srodnih *Xanthomonas* sojeva uključenih u analizu.

U ovom radu ukazano je na postojanje genetičkog diverziteta unutar Xac populacije. Potvrđena je taksonomska pozicija patogenog varijeteta *corylina*, ali i bliska filogenetska srodnost unutar vrste *X. arboricola*, koja

otežava razvoj specifičnih molekularnih metoda za diferencijaciju sojeva do nivoa patovara.

Ključne reči: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac), genetički diverzitet, molekularni markeri

Istraživanja su obavljena u okviru projekta III46008 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, i EU projekta AREA, br. 316004.

IZOLOVANJE I KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKIH SOJEVA KONZORCIJUMA MIKROORGANIZAMA KOJI RAZGRADUJU P-NITROFENOL

M. Lješević¹, B. Kekez¹, G. Gojgić-Cvijović², V. Beškoski¹,
M.M. Vrvic¹

¹Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

²ICHtM – Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

P-nitrofenol (PNP) je nitroaromatično jedinjenje široko rasprostranjeno u životnoj sredini u celom svetu, a potiče iz industrije boja, lekova, plastike, eksploziva ili pesticida (1). Po klasifikaciji Agencije za zaštitu životne sredine Sjedinjenih američkih država (US-EPA), PNP se smatra prioritetnom zagađujućom supstancom, a njegova koncentracija u prirodnim vodama treba da bude manja od 10 ng/L (2). U okviru ovog rada ispitivan je potencijal biodegradacije PNP pomoću konzorcijuma mikroorganizama izolovanih iz uzorka zagađenog sedimenta (uzorak iz kanala otpadnih voda južne industrijske zone u Pančevu). Iz ovog konzorcijuma izolovano je pet čistih kultura.

Biodegradacioni potencijal određivan je "enrichment" metodom na tečnoj mineralnoj podlozi u prisustvu rastuće koncentracije PNP kao jedinim izvorom ugljenika i azota. Proces biodegradacije praćen je spektrofotometrijski. Izolovane čiste culture su analizirane biohemijskim i molekularnim tehnikama. Za identifikaciju sojeva korišćena je analiza 16s rDNA sekvence. Konzorcijum mikroorganizama uspešno je razgradio do 100 mg/L PNP. Iz ovog konzorcijuma izolovano je pet čistih kultura: *Ochrobactrum sp*, *Shinella sp*, *Chryseobacterium sp*, *Comamonas sp*, *Ochrobactrum sp*. Sekvence 16s rDNA ovih sojeva deponovane su u GenBank bazi podataka.

REFERENCE:

1. Kitagawa et al. Journal of Bacteriology. **186** (2004) 4894.
2. Zohar S et al. International Biodeterioration & Biodegradation **84** (2013) 80.

IZOLOVANJE I BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA MIKROORGANIZAMA IZOLOVaniH IZ AKTIVNOG MULJA POSTROJENJA ZA PRERADU OTPADNIH VODA "HIP PETROHEMIJA" PANČEVO

Marija Radoja¹, Slađana Popović¹, Mila V. Ilić², Gordana Gojgić-Cvijović², Vladimir P. Beškoski¹, Miroslav M. Vrvic¹

¹Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu ²Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

Pojedini mikroorganizmi zagađenih lokaliteta poseduju biohemijske mehanizme koji im omogućuju da zagađujuće supstance koriste kao izvor ugljenika i/ili elektrona. Bioremedijacija se može definisati kao proces u kome se koriste ovi mikroorganizmi ili njihovi enzimi za vraćanje narušene životne sredine u originalno stanje, pri čemu se zagađujuće supstance biološkim putem transformišu u manje toksična jedinjenja [1]. Cilj ovog rada je bio da se izoluju i biohemijski okarakterišu mikroorganizmi iz aktivnog mulja fabrike otpadnih voda "HIP Petrohemija" u Pančevu.

Iz aktivnog mulja fabrike otpadnih voda "HIP Petrohemije" izolovane su i selekcionisane bakterijske kulture koje su pokazivale rast na mineralnoj podlozi sa naftnim ugljovodonicima (dizel D2) kao jednim izvorom ugljenika. Čiste kulture su izolovane metodom iscrpljenja trostrukim presejavanjem na hranljivi agar. Izolati su pre eksperimenata biodegradacije okarakterisati sledećim biohemijskim i mikrobiološkim testovima: katalaza test, oksidaza test, rast na Simonsovoj citratnoj podlozi, rast na MacConkey agaru, *Bacillus* test, test temperaturne stabilnosti (rast na 4, 28 i 41°C), test oksidacije/fermentacija glukoze na Hugh Leifson podlozi i ispitivanje osetljivosti mikroorganizama na antibiotike. Izolati su okarakterisani komercijalnim API BioMérieux (Analytical Profile Index) testovima: API Coryne, API 20E i API 20NE. Identifikovane su sledeće bakterijske vrste koje imaju mogućnost biodegradacije ugljovodonika su: *Brevibacterium sp.* (95,9 %), *Corynebacterium sp.* (96,8 %), *Pseudomonas sp.* (98,2 %), *Pasteurella sp.* (99,6 %).

Ključne reči: aktivni mulj, mikroorganizmi, bioremedijacija, API test

REFERENCE:

1. Hui W., *Int. Biodeter Biodegr* 85 (2013), 400.

UTICAJ STARTER KULTURE NA PROMENU MIKROBIOTE TOKOM PROIZVODNJE PETROVAČKE KOBASICE

Bojana Milićević¹, Bojana Danilović¹, Natalija Džinić² i Dragiša Savić¹

¹Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Srbija

²Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

Ciljevi: U ovom radu praćena je promena mikrobiote Petrovačke kobasice (Petrovská klobása) pripremljene uz dodatak starter kultura i fermentisane u kontrolisanim mikroklimatskim uslovima.

Metode: Uzorci kobasica su pripremani bez startera (A), sa starter kulturom *Staphylococcus xylosus* 4S-3 (B) i kombinacijom starter kultura *Lactobacillus sakei* B28-20 i *Staphylococcus xylosus* 4S-3 (C). Starter kulture su pripremljene od bakterijskih sojeva izolovanih iz Petrovačke kobasice. Uzorci su fermentisani na temperaturi 14-16°C (uzorci sa oznakom 1) i na temperaturi manjoj od 10°C (uzorci sa oznakom 2) u trajanju od 120 dana. U toku istraživanja praćena je promena broja: mezofilnih aerobnih bakterija (MAB) (hranljivi agar), stafilokoka (MSA podloga) i bakterija mlečne kiseline (BMK) (MRS agar).

Rezultati: Na početku broj MAB i BMK naglo raste sa početne vrednosti od 4,6-5,1 log CFU/g do 8,1-8,7 log CFU/g. Izuzetak predstavlja uzorak C2 gde je primećen pad broja MAB i BMK nakon 60 dana trajanja procesa na 6,1 i 6,4 log CFU/g, respektivno. Početni broj stafilokoka iznosi 4,2-4,4 log CFU/g, dok je na kraju procesa uočeno smanjenje do 2 log CFU/g za uzorak C2, odnosno do 3 log CFU/g za sve ostale uzorke.

Zaključak: Promena ukupnog broja MAB i BMK se odvija na sličan način nezavisno od temperaturnog opsega u svim uzorcima, pri čemu BMK predstavljaju dominantnu mikrobiotu. Dodatak startera nije uticao na promenu broja BMK. Broj stafilokoka se smanjuje tokom procesa proizvodnje usled smanjenja pH vrednosti izazvanog nagomilavanjem organskih kiselina nastalih kao proizvod metabolizma BMK.

Ključne reči: Petrovačka kobasica, bakterije mlečne kiseline, starter kulture

Rad je urađen u okviru projekta TR 31032 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja

POSTERI

MIKROMED 2015

ZASTUPLJENOST HEPATITIS C VIRUSNE INFEKCIJE U POPULACIJI JUŽNOBAČKOG OKRUGA

Nataša Nikolić¹, Hrnjaković Cvjetković I^{1,2}, Patić A^{1,2}, Radovanov J¹,
Kovačević G¹, Galović Jovanović A¹, Milošević V^{1,2}.

¹Institut za javno zdravlje Vojvodine, Centar za virusologiju

²Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

CILJ: Cilj rada je analiza zastupljenosti HCV infekcije u populacijama pod povećanim rizikom i opštoj populaciji Južnobačkog okruga.

MATERIJAL I METODE: Od januara 2013. do jula 2014. godine u Centru za virusologiju, Instituta za javno zdravlje Vojvodine ispitano je 12536 uzoraka seruma opšte populacije i populacije pod povećanim rizikom. Svi uzorci su testirani na prisustvo specifičnih anti HCV antitela enzimskim imunotestovima (ELISA, "DSI-EIA-ANTI-HCV", Italy) i potvrdnim Western blot testom (MP Diagnostics, HCV Blot 3.0, Germany).

REZULTATI: Prevalencija HCV infekcije kod 12536 uzoraka seruma iznosila je 2.21%. Infekcija je bila signifikantno zastupljenija u muškom polu ukupno (3.09% vs. 1.21%, $p < 0.0001$) kao i među uzrasnim grupama 26-34 (7.27% vs. 1.98%, $p < 0.0001$) i 35-44 (6.95% vs. 1.42%, $p < 0.0001$). U odnosu na uzrast najviša prevalencija je registrovana među ispitanicima uzrasta 26-34 godine (4.74%). Među klijentima centra za dobrovoljno poverljivo savetovanje i testiranje, anti HCV antitela dokazana su u 4.24% (73/1722) pri čemu je najveća prevalencija zabeležena u kategoriji injektirajućih korisnika droga (40.1%, 55/135). Od pregledanog zdravstvenog osoblja, nijedna osoba sa akcidentom nije imala antitela na HCV.

ZAKLJUČAK: Hepatitis C virusna infekcija u Južnobačkom okrugu najzastupljenija je među mladim osobama rizičnog ponašanja. Za efikasnu kontrolu i prevenciju HCV infekcije neophodna je primena savremenih laboratorijskih testova uz podizanje nivoa znanja o bolesti i promovisanje testiranja.

KLJUČNE REČI: HCV, ELISA, rizične grupe

Ova prezentacija je deo istraživanja u okviru projekta TR3 1084 pod pokroviteljstvom Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

RESPIRATORNE VIRUSNE INFEKCIJE KOD DECE JUŽNOBAČKOG OKRUGA

Aleksandra Patić^{1,2}, Hrnjaković Cvjetković I^{1,2}, Nikolić N¹, Radovanov J¹, Kovačević G¹,
Galović Jovanović A¹, Milošević V^{1,2}.

¹Institut za javno zdravlje Vojvodine, Centar za virusologiju

²Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

CILJ: Utvrđivanje učestalosti respiratornih infekcija izazvanih virusom parainfluence, respiratornim sincicijalnim virusom (RSV) i adeno virusom kod dece različitog uzrasta.

MATERIJAL I METODE: U dvogodišnjem periodu u Centru za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine serološki je pregledano na RS virus 768 obolele dece različitog uzrasta sa kliničkim znacima akutne infekcije respiratornog trakta. Pregledano je 1040 obolele dece na adeno virus i 72 dece na virus parainfluence. ELISA testom proizvođača Euroimmun za dokazivanje IgM i IgG antitela na navedene viruse pregledano su mala deca (starosti do 3 godine), predškolska deca (uzrasta 4-7 godina) i školska deca (uzrasta 8-15 godina).

REZULTATI: Akutna infekcija RS virusom dokazana je kod 26.69% dece. Najčešće su ove infekcije utvrđene kod predškolske dece (kod 29.41% pregledanih) i kod male dece (kod 26.61%), ali i kod školske dece (kod 23.60% pregledanih). Akutna infekcija virusom parainfluence utvrđena je kod 26.39% obolele dece i to najčešće kod predškolske dece (kod 33.33% pregledanih) i školske dece (kod 24.24%). Kod male dece ove infekcije su dokazane kod 11.11%. Akutna adenovirusna infekcija je dokazana kod 14.81% pregledane dece i to kod 17.43% predškolske dece, 14.10% male dece i 12.67% školske dece. Najveća učestalost respiratornih virusnih infekcija bila je u prva četiri meseca i u poslednja četiri meseca u godini.

ZAKLJUČAK: Dobijeni podaci ukazuju na neophodnost virusološke dijagnostike kod dece obolele od akutne respiratorne infekcije, pogotovo što se na osnovu kliničke slike ne može sa sigurnošću zaključiti čak ni da li je u pitanju bakterijska ili virusna infekcija, a taj podatak suštinski utiče na lečenje obolele dece.

Ključne reči: virus parainfluence, respiratorni sincicijalni virus, adeno virus

INNOVIROLOGY: MREŽA EVROPSKIH NASTAVNIKA/TRENERA ZA VIRUSOLOGIJU

INNOVIROLOGY: THE NETWORK OF EUROPEAN TEACHERS/TRAINERS OF VIROLOGY

E. Gómez-Lucía¹, A. Dolei², R. Lavigne³, S. LePoder⁴, C. Logue⁵, D. Radin⁶, M. Szyndel⁷, B. Wölk^{8,9}

¹Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, Španija;

²Università degli Studi di Sassari, Italija;

³Katholieke Universiteit Leuven, Belgija;

⁴Université Paris-Est. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Francuska ;

⁵Public Health England, Porton Down, Engleska;

⁶Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Srbija;

⁷Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Poljska;

⁸LADR GmbH, MVZ Kramer and Colleagues, Geesthacht,

⁹Medizinische Hochschule Hannover, Nemačka

Evropska Unija je, u okviru programa Erasmus+, finansirala inicijativu za inovacije u nastavi i obuci, kao i za poboljšanje diseminacije iz oblasti virusologije (Innovirology, broj projekta 2014-1-ES01-KA203-004962), u saradnji osam institucija iz različitih evropskih zemalja. Ideja je da se obrazuje mreža nastavnika virusologije, koja će omogućiti međusobno povezivanje, razmenu i razvijanje nastavnog materijala, i doprineti opštem širenju znanja iz oblasti virusologije. Specifični ciljevi uključuju:

- Kompilacija protokola za laboratorijsku nastavu iz virusologije, koje nastavnici odluče da podele, kako bi bilo koji član mreže imao slobodan pristup i mogućnost odabira laboratorijskih tehnika koje najviše odgovaraju studentima određene grupe.
- Stavljanje na raspolaganje nastavnicima virusologije specifične obrazovne alate koje je razvila mreža, kao što su (ali ne isključivo) informacione i komunikacione tehnologije (kompjuterski programi, igre, alati za samoprocenu i evaluaciju, itd).
- Razvijanje on-line kurseva za doživotno obrazovanje i približavanje virusologije onima koji su zainteresovani da nauče više. Kursevi „Šta su virusi?“, „Osnovna i primenjena virusologija“, „Klinička virusologija“, „Veterinarska virusologija“, „Biljni virusi“, „Molekularna dijagnostika virusa“, „Nove virusne bolesti“ i „Virusi u hrani“, će biti tako osmišljeni da ih može pratiti svako ko ima interesa za virusologiju. Takođe, konzorcijum ima za cilj da napiše knjigu o

virusologiji, koja bi bila sa slobodnim i otvorenim on-line pristupom. Namera je da se pripremi sa velikim brojem ilustracija koje bi bile atraktivne učenicima srednjih škola i generalno široj publici.

- Kreiranje i održavanje društvenih mreža (Facebook, twitter, itd) o vestima na svim poljima virusologije.

Svi nastavnici u Evropi su dobrodošli da se pridruže mreži. Ovaj poziv uključuje sve zainteresovane nastavnike virusologije nezavisno od vrste institucije, oblasti ili subspecijalnosti. Na kraju projekta biće pripremljen upitnik za ocenu korisnosti različitih aspekata projekta, za koji verujemo da će pomoći studentima i javnosti da se bolje upoznaju sa različitim aspektima virusologije.

Ključne reči: virusologija, mreža evropskih nastavnika

UČESTALOST IZOLACIJE I ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST ESBL PRODUKUJUĆIH ENTEROBAKTERIJA UZROČNIKA URINARNIH INFEKCIJA

Jasminka Bokan-Hajnal, Gordana Kovrlija

Mikrobiološka laboratorija, Bolnica „Dr Mladen Stojanović“, Prijedor, Republika Srpska

CILJEVI: Na području grada Prijedora nisu rađene studije o učestalosti i osjetljivosti na antibiotike bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* izolovanih iz urina bolničkih i ambulantno liječenih pacijenata. U ovom radu je ispitana učestalost ESBL produkujućih enterobakterija izolovanih iz urina bolničkih i ambulantno liječenih pacijenata, kao i njihova osjetljivost na najčešće korišćene antibiotike u terapiji urinarnih infekcija.

METODE: U periodu od 1.1.2011. godine do 31.12.2014. godine u mikrobiološkoj laboratoriji bolnice „Doktor Mladen Stojanović“ u Prijedoru obrađeno je 22 032 urina bolničkih i ambulantno liječenih pacijenata. Osjetljivost na gentamicin, netilmicin, ertapenem, imipenem, ciprofloksacin, nalidiksnu kiselinu, i trimetoprim/sulfometoksazol je rađena disk difuzionom metodom prema EUCAST uputstvima ESBL produkujući sojevi su potvrđeni fenotipski testom sinergizma sa diskovima ceftriaksona, ceftazidima i amoksicilina sa klavulanskom kiselinom (Double-Disc Sinergy Test).

REZULTATI: Tokom četvorogodišnjeg perioda signifikantna bakteriurija je utvrđena kod 4930 (22,3%) urina. Učestalost ESBL produkujućih enterobakterija je bila sljedeća: *Enterobacter-Klebsiella sp.* (1,82%), *E.coli* (1,64%), *Proteus mirabilis* (0,6%), *Morganella morganii* (0,04%) i *Citrobacter freundii* (0,02%). *Enterobacter-Klebsiella sp.* je češće izazivao infekcije kod muških pacijenata i u bolničkoj (72%) i u vanbolničkoj (88%) populaciji. *E. coli* je bila češći uzročnik među ženskim pacijentima i u bolničkoj (60%) i u vanbolničkoj (67%) populaciji, dok je *Proteus mirabilis* gotovo podjednako izazivao infekcije kod oba pola. Svi ispitivani sojevi su bili osjetljivi na ertapenem i imipenem. Osjetljivost na gentamicin za bolničke/vanbolničke izolate je bila sljedeća: *E.coli* 14,3%/ 19,7%, *Enterobacter-Klebsiella sp.* 20%/43,8% i *Proteus mirabilis* 16,7%/16,7%. Osjetljivost na ciprofloksacin za bolničke/vanbolničke izolate je bila sljedeća: *E.coli* 28%/41,1%, *Enterobacter-Klebsiella sp.* 28,6%/31,8% i *Proteus mirabilis*

0%/17,4%. Nije uočena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u osjetljivosti na ispitivane antibiotike između bolničkih i vanbolničkih izolata.

ZAKLJUČAK: ESBL produkujuće enterobakterije izolovane iz urina bolničkih i vanbolničkih pacijenata su pokazale podjednak i visok stepen rezistencije na antibiotike koji se koriste u terapiji urinarnih infekcija.

Ključne riječi: ESBL, enterobakterije, antibiotici

MOLEKULARNA DETEKCIJA *H. PYLORI* METODOM RT-PCR U KLINIČKOM MATERIJALU

Vesna Protić-Đokić, Dragutin Jovanović, Sonja Atanasievska, Elizabeta Ristanović
Institut za mikrobiologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija

UVOD: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) je gram-negativna mikroaerofilna bakterija i jedna od čestih bakterijskih patogena ljudi. Izaziva bolesti gornjeg dela digestivnog sistema kao što su: želudačni i duodenalni ulkus, gastritis, adenokarcinom želuca, gastrični MALT-limfom. Osim u želucu otkrivena je i u aftama sluznice usne šupljine, u zubnom plaku, u pljuvački i u stolici. Široku paletu testova za dokazivanje infekcija izazvanih *H. pylori* čine invazivni testovi kao i neinvazivni testovi čijem se razvoju u poslednje vreme poklanja sve veća pažnja.

CILJ RADA: Detekcija *H. pylori* molekularnom metodom RT-PCR u brisu bukalne sluznice ljudi i u sluznici želuca. Komparacija dobijenih rezultata sa rezultatima histološkog nalaza sluznice želuca, u periodu od 2014. do 2015. godine u Institutu za mikrobiologiju VMA, Beograd.

METODA: Kod 30 pacijenata u procesu primarne dijagnostike je urađena ciljana biopsija želuca i uzet je bris bukalne sluznice. Uzorci su pripremljeni za molekularnu analizu RT-PCR (Sacace) kvalitativni test i dodatno za biopat želuca urađena je i histološka analiza.

REZULTATI: Od ukupnog broja ispitanih uzoraka brisa bukalne sluznice 11 je bilo pozitivno (36%), kod uzoraka bioptata želuca pozitivnih je bilo 18 (60%). Kod deset pacijenata oba uzoraka (bris bukalne sluznice u biopat želuca) su bila negativna (33%). Histološki nalaz bioptata želuca se u potpunosti slagao sa RT-PCR nalazom kod 25 pacijenata (83%), dok kod 5 uzoraka bioptata želuca (17%) histološki nalaz je bio negativan, a RT-PCR je bio pozitivan.

ZAKLJUČAK: Dobijeni rezultati ukazuju na prisustvo *H. pylori* u bukalnoj sluznici i u bioptatu želuca kod većine uzoraka. Rutinska primena RT-PCR omogućila bi prevazilaženja nekih dilema u dijagnostici infekcija izazvanih *H. pylori* pogotovo kada su u pitanju klinički uzorci sa malim brojem bakterija. Poželjna bi bila i kod pacijenata gde se

preporučuje neinvazivna metoda dijagnostike, kao što je bris bukalne sluznice i u epidemiološkim studijama.

Ključne reči: *Helicobacter pylori*, RT-PCR, bris bukalne sluznice, bioptat želuca.

PRIKAZ SLUČAJA SALMONELOZNOG PERITONITISA IMUNOKOMPROMITOVANOG DETETA

G.Jovanović, S.Matic, R. Popović, T.Tojčić - Odeljenje mikrobiologije Opšte bolnice
Valjevo, A.Kitić
Odeljenje dečje hirurgije Opšte bolnice Valjevo

UVOD: Salmonela je gram negativni bakterijski rod u okviru koga se razlikuje više vrsta i podvrsta koje izazivaju: tifoidne groznice, alimentarne toksinfekcije, enteritise i sepse. Kod imunokompromitovanih izazivaju ređe kliničke forme: peritonitise, holecistitise, meningitise, urinarne pa čak i respiratorne infekcije.

CILJ: Prikaz slučaja salmoneloznog peritonitisa imunološki kompromitovane devojčice od osam godina je, kao redak patološki entitet koji je razrešen na hirurškom stolu, ukazao na važnost pravovremenog uzorkovanja materijala za bakteriološku dijagnostiku.

METOD: Devojčica stara 8 godina koja primarno boluje od Tarnerovog sindroma, primljena na odeljenje Dečje hirurgije Opšte bolnice Valjevo zbog jakih bolova u trbuhu. Unazad nedelju dana imala tečne stolice. U krvnoj slici se uočava **leukocitoza**. Konstatovani: **Peritonitis acuta i Rigiditas abdominalis**. Nakon pripreme, dete operisano. Treći dan po intervenciji otpusteno oporavljeno. Po ileocekalno učinjenom rezu, intraabdominalno se izlivao gnojni sadržaj bez znakova perforacije apendiksa i po retrogradnoj apendektomiji uzet je **bris peritoneuma** intraoperativno i poslat u *Mikrobiološku laboratoriju*. Prispeli bris je zasejan i na selektivne podloge selenit F bujon i SS agar jer se znalo da se radi o detetu koje je unazad nekoliko dana imalo tečne stolice. Drugog dana po inkubaciji presejavanjem selenit F bujona na čvrsti SS agar, porasle su vrlo sitne, oskudne jedva uočljive laktoza negativne kolonije bez razvijenog vodonik sulfida, ali vrlo suspektne na neku crevnu patogenu bakteriju. Sledećeg dana kratkom biohemijskom serijom je potvrđena salmonela, koja je aglutinacijom na pločici identifikovana kao **Salmonela enteritidis**.

ZAKLJUČAK: Na ovom primeru se vidi da je dobro funkcionisanje lanca hirurg, transport materijala i mikrobiolog, dovelo do pravilnog postavljanja etiološke dijagnoze slučaja.

Ključne reči: Peritonitis acuta, Bris peritoneuma, Salmonella enteritidis

MIKROBIOLOŠKA KONTROLA TALOGA ALBUMINA U PROCESU PROIZVODNJE HUMANOG ALBUMINA

Milosavljević Slavica, Balint Laura
Odsek za kontrolu kvaliteta,
Institut za transfuziju krvi Srbije, Beograd

UVOD: Humana plazma za frakcionisanje predstavlja aktivnu supstancu za proizvodnju stabilnih produkata krvi kao što je Humani albumin. U Odeljenju za frakcionisanje plazme Instituta za transfuzionisanje krvi Srbije proizvodi se Humani albumin 20%. Zbog biološke prirode startnog materijala (plazme), proizvodnja i kontrola ovog produkta je specifična. Plazma se prikuplja iz različitih transfuzioloških centara u Srbiji. Svaka pojedinačna jedinica plazme se testira na HIV 1 i 2, HbsAg, HCV i sifilis. Takođe se plazma nakon puliranja testira na prisustvi hepatitis C virusa PCR metodom. U proizvodnji se koristi metod hladno etanolskog frakcionisanja po Cohn-u. U toku frakcionisanja dobija se talog albumina kao aktivna supstanca. Talog albumina taloži se na pH 4,8 i predstavlja belu polučvrstu pastu sa sadržajem ukupnih proteina $\geq 45\text{g/L}$ i čistoćom od min. 95% čistog albumina. Zbog biološke prirode aktivne supstance, humani albumin ne podleže finalnoj sterilizaciji. Umesto nje, primenjuje se proces pasterizacije u trajanju od 10 sati.

CILJ: Ispitati mikrobiološku čistoću taloga albumina pre finalizacije proizvoda Humanog albumina a u skladu sa zahtevima SZO (Preporuke SZO za proizvodnju i kontrolu humane plazme za frakcionisanje). Ispitali smo talog albumina na prisustvo bakterijske i mikološke kontaminacije. Dozvoljeni broj mikroorganizama u talogu albumina je $\leq 10^4$ cfu/ml.

METODE: Za ispitivanje smo koristili mikrobiološki test- test sterilnosti po preporuci Evropske farmakopeje. U ispitivanju sterilnosti, koristili smo tri vrste hranljivih podloga; tripton soja bujon, tečnu Sabouraud podlogu i tioglokolatnu podlogu. Zasejane podloge su inkubirane 15 dana uz svakodnevno praćenje porasta mikroorganizama.

REZULTATI: U toku petogodišnjeg perioda (januar 2010.-decembar 2014.) ispitano je ukupno 59 taloga albumina. Svi ispitivani talozi bili su

sterilni. Rezultati potvrđuju da brojne sterilne filtracije u toku procesa frakcionisanja plazme dovode do eliminacije mikroorganizama.

ZAKLJUČAK: S obzirom na rezultate mikrobiološkog ispitivanja taloga albumina prizvedenog iz humane plazme u Institutu za transfuziju krvi Srbije možemo zaključiti da je Humani albumin 20% bezbedan za humanu upotrebu.

IMPORTOVANA DIFILOBOTRIJAZA U CRNOJ GORI – PRIKAZ SLUČAJA

Rajna Dapčević, Žarko Nikčević, Dunja Nikčević
PZU "Krapović Medical" Budva, Crna Gora

Pantljičare iz roda *Diphyllbothrium* ("riblje pantljičare") spadaju u najveće humane parazite sa dužinom do 15m, a mogu živjeti i do 20 godina. Procjenjuje se da je ovom infekcijom zahvaćeno oko 20 miliona ljudi širom svijeta, a vezuje se za regione u kojima se konzumira svježa ili termički nedovoljno obrađena riba. U Evropi je česta u baltičkim i skandinavskim zemljama, zatim u Poljskoj, Rumuniji i Rusiji, te područjima oko alpskih jezera u Švajcarskoj, Francuskoj i Italiji. Nije nam poznato da je opisan neki slučaj na području država nekadašnje Jugoslavije. U radu se prikazuje prvi registrovani, iako importovani, slučaj difilobotrijaze u Crnoj Gori.

Roditelji djevojčice stare dvije godine, porijeklom iz Rusije, koji su kao turisti boravili u Crnoj Gori, primijetili su "bijelu traku" koja izlazi iz čmara njihove ćerke. Na mikrobiološki pregled su pored nje donijeli i stolicu djeteta. Kod djeteta nisu primijećeni neki simptomi oboljenja, izuzev nemirnog sna u poslednjih mjesec dana, te crvenila oko čmara. Anamnezom je utvrđeno da su konzumirali kavijar sa Bliskog Istoka. Dio parazita donešen na pregled, dug oko 40 cm, bio je člankovite strukture i bez prisustva glave (scolexa). Mikroskopskim pregledom (uvećanje 10x) u središnjem dijelu članaka uočen je genitalni aparat sa tamnim uterusom tipične rozetne građe. Mikroskopskim pregledom stolice utvrđeno je prisustvo velikog broja neembrionisanih jaja ovalnog oblika, sa poklopcem (operculum), koji morfološki odgovaraju jajima riblje pantljičare.

Razvojem Crne Gore kao turističke destinacije, dolaskom turista iz raznih krajeva svijeta, promjenom navika u ishrani i ponudi na hotelskim menijima (svježa riba, kavijar, suši), te globalizacionim procesima u trgovini hranom koji omogućavaju uvoz svježe ribe iz udaljenih endemskih područja, stvaraju se uslovi za pojavu difilobotrijaze i sličnih endemskih infekcija koje do sada nisu registrovane kod nas.

Ključne riječi: *Diphyllbothrium*, riblja pantljičara, Crna Gora

OSETLJIVOST *PROTEUS MIRABILIS* BIOFILMA NA PRISUSTVO EKSTRAKATA BILJAKA I LIŠAJEVA

Sava M. Vasić, Ivana D. Radojević, Olgica D. Stefanović, Ljiljana R. Čomić
Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

CILJEVI: *Proteus mirabilis* je dobro poznata bakterijska vrsta koja formira biofilm i između ostalog u čoveku kao domaćinu može da izazove urinarne infekcije i napravi biofilm na medicinskim uređajima. Testirali smo različite ekstrakte kako bi uvideli njihov uticaj na *P. mirabilis* biofilm.

METODE: Ekstrakti dobijeni od pet vrsta paprati, četiri vrste lišaja i tri vrste cvetnica su testirani na *P. mirabilis* biofilmu pomoću ploča za tkivnu kulturu u testu sa kristal violetom i procedure sa klinastim poklopcem i dobijene su biofilm inhibitorne koncentracije (BIC).

REZULTATI: Najbolja antibiofilm vrednost od svih testiranih ekstrakata je dobijena sa *Polystichum aculeatum* etil acetatnim ekstraktom gde je BIC na 0.3 mg/ml. Sveukupno, ekstrakti lišajeva su imali bolje antibiofilm delovanje od drugih ekstrakata (BIC vrednosti od 0.6 do 2.5 mg/ml).

ZAKLJUČAK: Ekstrakti su uticali na formiranje *P. mirabilis* biofilma sa različitim efektom. U isto vreme, rezultati ovog istraživanja pokazuju složenost prirode ekstrakata i bakterijskog biofilma.

Ključne reči: *Proteus mirabilis*, biofilm, ekstrakti

ANTIBAKTERIJSKI I CITOTOKSIČNI EFEKAT ETARSKOG ULJA THYMUS CAPITATUS HOFFMS. ET LINK.

Bojana Jovanović¹, Marina Jovanović¹, Biljana Nikolić¹, Dragana Mitić-Ćulafić¹, Ana Džamić², Petar Marin², Jelena Knežević-Vukčević¹

¹Katedra za mikrobiologiju,

²Katedra za morfologiju i sistematiku biljaka,

Institut za botaniku i Botanička bašta "Jevremovac", Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Thymus capitatus se koristi u narodnoj medicini u lečenju različitih bolesti digestivnog i respiratornog sistema, a farmakološka ispitivanja ukazuju na brojne biološke aktivnosti. U ovom radu je ispitan antibakterijski i citotoksični efekat etarskog ulja (EO) vrste *Th. capitatus* i dominantnih komponenti karvakrola (K) i timola (T). Takođe je ispitan potencijal ovih supstanci za prevenciju kolonizacije gastrointestinalnog trakta od strane patogenih bakterija.

Antibakterijski efekat je ispitan mikrodilucionom metodom prema odabranim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijskim sojevima: *Listeria monocytogenes* (NCTC 79973), *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Proteus mirabilis* (humani izolat). Citotoksični efekat je ispitan MTT testom na odabranim humanim ćelijskim linijama kolorektalnog karcinoma (HT-29 i HCT-116) i fibroblastima plućnog tkiva fetusa (MRC-5). U testu adhezije enteropatogena *E. coli* (ATCC 8739) i *L. monocytogenes* (ATCC 19111) na ćelije HT-29 praćen je inhibitorni efekat EO, K i T.

Rezultati ukazuju na veoma male minimalne inhibitorne koncentracije (MIC vrednosti), odnosno izrazito jak antibakterijski efekat testiranih supstanci, što je najizraženije u slučaju EO. Kako je ispitivanje efekta na humanim ćelijama pokazalo da je citotoksičnost umerena, bilo je moguće ispitivati efekat koncentracija netoksičnih u sisarskim ćelijama na adheziju enteropatogenih bakterija na ćelije kolona. Rezultati su pokazali da su EO, K i T inhibirali adheziju *E. coli* (39%, 24% i 30% inhibicije), a naročito *L. monocytogenes* (51%, 49% i 46%).

Snažan antibakterijski potencijal i inhibicija kolonizacije enteropatogenih bakterija opravdava upotrebu *Th.capitatus* u tradicionalnoj medicine i preporučuje dalja ispitivanja njegovih bioloških aktivnosti.

Ključne reči: *Thymus capitatus*, antibakterijska aktivnost, citotoksična aktivnost.

KARAKTERIZACIJA PROBIOTSKIH SVOJSTAVA HUMANIH IZOLATA LACTOBACILLUS PLANTARUM

Marina Jovanović¹, Jelena Novaković Jovanović², Nikolić Biljana¹, Šeatović Svetlana²,
Zavišić Gordana², Mitić-Ćulafić Dragana¹, Vuković-Gačić Branka¹, Knežević-Vukčević
Jelena¹

¹University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

²Galenika ad, Belgrade, Serbia

Probiotici su živi mikroorganizmi koji imaju blagotvorno dejstvo na zdravlje domaćina, učestvujući u održavanju ravnoteže gastrointestinalnog trakta (GIT). Cilj ovog istraživanja je ispitivanje probiotičkih svojstava odabranih sojeva laktobacila izolovanih iz oralnih i fekalnih uzoraka zdrave novorođenčadi. Od 126 sojeva 7 je preliminarno determinisano kao laktobacili (Lac1-Lac7). Biohemijska identifikacija pomoću API 50 CHL je potvrdila da pripadaju rodu *Lactobacillus*, a genotipska karakterizacija pomoću 16S rDNK je pokazala da sojevi Lac1, Lac2, Lac6 i Lac7 pripadaju vrsti *Lactobacillus plantarum*.

Dalja karakterizacija je pokazala da ispitivani sojevi rastu na temperaturama od 15-40°C, pH od 2-8 i koncentracijama NaCl od 2.0-6.5%. Dokazana je produkcija mlečne i buterne kiseline, bez produkcije gasa, kao i odsustvo hemolize. Ustanovljena je izražena rezistencija na lizozim, kiselu sredinu i prisustvo žučnih soli, a dokazana je mogućnost zadržavanja vijabilnosti prilikom prolaska kroz GIT usled visoke stope preživljavanja u veštačkim želudačnim (preživljavanje 82-87%) i crevnim tečnostima (preživljavanje preko 98.6%). Uočen je antibakterijski potencijal protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija koji se pripisuje snižavanju pH, dok antifungalni potencijal nije uočen. Odlikuje ih sposobnost formiranja autoagregata i koagregata sa testiranim patogenima (*Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*). Imaju sposobnost adhezije na heksadekan (67-78%), kao i HCT 116 ćelije u kulturi (5,8-9,1%).

Rezultati ukazuju da svi izolati imaju dobra probiotička svojstva, sa nešto lošijim karakteristikama soja Lac1, te se preporučuju za dalja ispitivanja u *in vivo* sistemima i u kliničkim studijama.

Ključne reči: Probiotička svojstva, humani izolati *Lactobacillus plantarum*

ANTIVIRUSNO DEJSTVO KOMPLEKSA PALADIJUMA(II) I PLATINE(II) SA 2-(DIFENILFOSFINO)BENZALDEHID 1- ADAMANTOIL HIDRAZONOM

Simić¹ Vera, Kolarević² Stoimir, Brčeski Ilija³, Jeremić³ Dejan, Vuković-Gačić² Branka

¹Nacionalna kontrolna laboratorija, Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije,
Beograd, Srbija

²Centar za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju, Katedra za Mikrobiologiju,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

³Katedra za opštu i neorgansku hemiju, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
Beograd, Srbija

UVOD: Derivati adamantana i jedinjenja sa adamanil grupom koriste se kao antivirusni lekovi. Postoje podaci koji ukazuju da ova jedinjenja ispoljavaju antivirusnu aktivnost u odnosu na viruse familije *Picornaviridae*, u koje spada i poliovirus tip 1, predstavnik roda *Enterovirus*. Ligand 2-(difenilfosfino)benzaldehyd 1-adamantol hidrazon i njegovi kompleksi paladijuma(II) i platine(II) su biološki aktivna jedinjenja, ali njihova antivirusna aktivnost do sada nije ispitivana.

CILJ: Cilj rada je ispitivanje antivirusne aktivnosti novosintetisanih kompleksa paladijuma(II) i platine(II) sa 2-(difenilfosfino)benzaldehyd 1-adamantol hidrazonom na poliovirus tip 1 – Hep-2 model-sistemu i ispitivanje uticaja ovih jedinjenja na specifične receptore na ćelijama Hep-2 i adsorpciju virusa, kao i na inhibiciju rasta virusa u fazama virusnog infektivnog ciklusa koje slede penetraciju.

METODE: Ispitivanje antivirusne aktivnosti vršeno je mikrotitracionom metodom, praćenjem redukcije citopatogenog efekta (CPE) indukovano poliovirusom tip 1, pomoću UptiBlueTM eseja, nakon tretmana pre i posle virusne infekcije ćelija. Za propagaciju poliovirusa tip 1 korišćena je Hep-2 kontinuirana ćelijska linija koja vodi poreklo od epitelnih ćelija humanog karcinoma larinksa.

REZULTATI: Dobijeni rezultati pokazuju da ligand 2-(difenilfosfino)benzaldehyd 1-adamantol hidrazon i njegov kompleks platine(II) indukuju redukciju rasta poliovirusa tip 1.

Nakon tretmana pre virusne infekcije, najveća redukcija CPE od $24.42 \pm 1.49\%$ detektovana je za 2-(difenilfosfino)benzaldehyd 1-

adamantoil hidrazon na koncentraciji 19 μM . Nakon tretmana posle infekcije, najveća redukcija CPE od $30.52 \pm 3.12\%$ detektovana je za kompleks platine(II) na koncentraciji 17 μM . Kompleks paladijuma(II) nije pokazao antivirusnu aktivnost.

ZAKLJUČAK: Rezultati naših ispitivanja potvrđuju da 2-(difenilfosfino)benzaldehyd 1-adamantoil hidrazon i njegov kompleks platine(II) redukuju porast poliovirusa tip 1 i da mogu biti dalje razmatrani kao antivirusni agensi.

Ključne reči: Metalni kompleksi, poliovirus, UptiBlueTM esej.

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST KOMPLEKSA PALADIJUMA(II)
I PLATINE(II) SA 2-(DIFENILFOSFINO)BENZALDEHID 1-
ADAMANTOIL HIDRAZONOM**

Simić¹ Vera, Kolarević² Stoimir, Brčeski Ilija³, Jeremić³ Dejan, Rajko Čebedžić¹,
Vuković-Gačić² Branka

¹Nacionalna kontrolna laboratorija, Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije,
Beograd, Srbija

²Centar za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju, Katedra za Mikrobiologiju,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

³Katedra za opštu i neorgansku hemiju, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
Beograd, Srbija

UVOD: Metalna kompleksna jedinjenja nalaze sve veću primenu u medicini jer se koriste u lečenju brojnih oboljenja. Poslednjih godina ispitivana je biološka aktivnost nekoliko acilhidrazonskih derivata 2-(difenilfosfino)benzaldehida i njihovih metalnih kompleksa, a publikovani rezultati ukazuju da ova jedinjenja poseduju značajnu antimikrobnu i antitumorsku aktivnost.

CILJ: Cilj rada je ispitivanje antimikrobne aktivnosti novosintetisanih kompleksa paladijuma(II) i platine(II) sa 2-(difenilfosfino)benzalhid 1-adamantoil hidrazonom na odabranim sojevima bakterija i gljivica: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Mycobacterium bovis* (bacillus Calmette-Guérin, BCG), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Salmonella abony* (NCTC 6017) i *Candida albicans* (ATCC 10231).

METODE: Ispitivanje je vršeno mikrotitracionom metodom, detekcijom rasta odabranih sojeva mikroorganizama u prisustvu novosintetisanih jedinjenja, primenom UptiBlue™ eseja. Antimikrobna aktivnost je kvantifikovana određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) i minimalnih baktericidnih/fungicidnih koncentracija (MBK/MFK) ispitivanih jedinjenja.

REZULTATI: Najveća antimikrobna aktivnost detektovana je za 2-(difenilfosfino)benzalhid 1-adamantoil hidrazon u odnosu na soj *M. bovis* (MIK/MBK=77.1 µM). Isto jedinjenje pokazalo je antibakterijsko dejstvo u odnosu na sojeve *S. aureus* i *B. subtilis* (MIK-316.2 i 634.5

μM). Antimikrobna aktivnost kompleksa paladijuma(II) detektovana je u odnosu na sojeve *S. aureus* i *B. subtilis*, sa MIK vrednostima $656.7 \mu\text{M}$ i $328.4 \mu\text{M}$. Najveća baktericidna aktivnost kompleksa paladijuma(II) primećena je na soju *B. subtilis* ($328.4 \mu\text{M}$). Kompleks platine(II) ispoljava antibakterijsku aktivnost u odnosu na soj *B. subtilis* (MIK= $217.6 \mu\text{M}$, MBK= $433.1 \mu\text{M}$).

ZAKLJUČAK: Rezultati naših ispitivanja ukazuju da kompleksi paladijuma(II) i platine(II) sa 2-(difenilfosfino)benzalhid 1-adamantoil hidrazonom poseduju antibakterijsku aktivnost, sa izrazitim efektom na soj *Mycobacterium bovis*.

Ključne reči: Metalni kompleksi, antimikrobna aktivnost, UptiBlue™.

PRIMENA IBR METODE (INTEGRATED BIOMARKER RESPONSE) U MIKROBIOLOŠKOJ ANALIZI VODENIH EKOSISTEMA

Jovana Kostić^{1,2}, Karolina Sunjog^{1,2}, Stoimir Kolarević¹, Margareta Kračun-Kolarević³,
Mustafa Aborgiba¹, Jelena Knežević-Vukčević¹, Branka Vuković-Gačić¹

¹ Katedra za mikrobiologiju, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

² Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

³ Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

UVOD: Mikrobiološki indikatori sanitarnog i organskog zagađenja čine neophodan segment svake procene kvaliteta vode. Međutim, kako se velike količine neprerađenih ili nepropisno prerađenih otpadnih voda ispuštaju u vodotokove teško je razdvojiti sanitarno od organskog zagađenja. Vizuelni prikaz rezultata IBR metodom pokazao se veoma korisnim u analizi međusobnih odnosa različitih biomarkera i ima široku primenu u biomonitoringu. Osim primene na biomarkerima, metoda može da pokaže i uzajamne odnose različitih hemijskih parametara. Metoda IBR do sada nije korišćena za analizu uzajamnih odnosa mikrobioloških parametara.

CILJEVI: Primena IBR metode u proceni kvaliteta vode, pri čemu su mikrobiološki parametri fekalnog i organskog zagađenja korišćeni kao "biomarkeri".

METODE: Za potrebe ove studije odabrana su dva seta podataka. Prvi set je dobijen tokom višemesečnog monitoringa na reci Savi tokom 2014. godine, uključujući i period sa poplavom, tj. maj mesec. Od indikatora fekalnog zagađenja praćeni su totalni koliformi, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Clostridium perfringens*. Nivo organskog zagađenja određen je na osnovu odnosa heterotrofnih i oligotrofnih bakterija, i indeksa fosfatazne aktivnosti. Drugi set podataka dobijen je tokom višemesečnog monitoringa sezonskog variranja mikrobioloških indikatora na reci Peštan, tokom 2012. godine. Od indikatora fekalnog zagađenja praćeni su totalni koliformi, *E. coli* i *E. faecalis*. Nivo organskog zagađenja određen je na osnovu odnosa heterotrofnih i oligotrofnih bakterija.

REZULTATI: Vizuelni prikaz rezultata IBR metodom dao je jasan uvid u minimalne i maksimalne vrednosti svakog od indikatora fekalnog i organskog zagađenja tokom različitih meseci. Za prvi set podataka, na osnovu grafika i na osnovu dobijenih IBR vrednosti, jasno se izdvaja mesec u kome je došlo do poplava. Za drugi set podataka očigledno je variranje mikrobioloških parametara tokom različitih sezona.

ZAKLJUČAK: Metoda IBR je pogodna za prikaz i analizu kompleksnog seta mikrobioloških podataka.

Ključne reči: integrated biomarker response (IBR), analiza mikrobioloških parametara, vodeni ekosistemi.

PRIMENA BAGREMOVOG MEDA U PROIZVODNJI FERMENTISANIH NAPITAKA NA BAZI SURUTKE

Maja Vukašinović-Sekulić¹, Marica Rakin¹, Maja Bulatović¹, Tanja Krunic²

¹Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

² Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

CILJEVI: Nutritivna i reološka svojstva fermentisanih mlečnih napitaka mogu se poboljšati korišćenjem različitih vrsta meda. Dodatkom meda može se stimulisati rast i očuvati stabilnost probiotskih vrsta bakterija tokom fermentacije i čuvanja, dok oligosaharidi iz meda, kao prebiotici, povoljno utiču na aktivnost probiotskih vrsta bakterija u intestinalnom traktu, čime se obezbeđuje pravilno funkcionisanje organizma.

METODE: U ovom radu ispitan je uticaj različitog sadržaja bagremovog meda (1%, 3%, 5%, 10%) na tok fermentacije mešavine surutke i mleka (70:30) primenom komercijalne liofilizirane starter kulture ABY-6, koja pored vrsta *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, sadrži i dve probiotske vrste *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*. Tokom fermentacije praćena je dužina trajanja procesa, postignuta titracijska kiselost i ukupan broj vrsta *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*. Nakon fermentacije, ispitana su fizičko-hemijska i senzorna svojstva dobijenih napitaka, kao i njihova stabilnost tokom čuvanja u frižideru (promena pH, kiselost, ukupan broj probiotskih bakterija, sinerezis).

REZULTATI: Fermentisani napici na bazi surutke bez i sa dodatkom 1%, 3% i 5% bagremovog meda, postigli su zadovoljavajuće vreme fermentacije od 3h, što odgovara vremenu koje je potrebno da se u industrijskim uslovima proizvedu fermentisani mlečni napici. Fermentacija u napitku sa 10% bagremovog meda trajala je pola sata duže, što potvrđuje da bagremov med ne pokazuje antimikrobnu aktivnost prema vrstama koje ulaze u sastav starter kulture ABY-6. Napici sa 1% i 3% bagremovog meda imali su zadovoljavajuće organoleptičke karakteristike, dok su napici sa 5% i 10% meda bili previše slatki, pa se mogu koristiti u kombinaciji sa određenim vrstama voća.

ZAKLJUČAK: Analiza mikroflore fermentisanih napitaka na bazi surutke pokazala je, da je tokom fermentacije i čuvanja, dominantna vrsta *Streptococcus thermophilus* i da se ukupan broj probiotskih bakterija, od preko 10^6 cfu/ml, može zadržati u proizvodu tokom 14 dana čuvanja u frižideru, što doprinosi njegovim probiotskim karakteristikama.

Ključne reči: bagremov med, napici na bazi surutke, probiotici

UTICAJ HIGIJENE PROCESA PROIZVODNJE NA MIKROBIOLOŠKU BEZBEDNOST SLADOLEDA

Ivana Filipović, Katica Mihajlović
SP Laboratorija, Bečej, Srbija

Higijena procesa proizvodnje je značajan faktor u proizvodnji mikrobiološki bezbednog sladoleda. Formiranje biofilmova na procesnim uređajima predstavlja potencijalni izvor kontaminacije sladoleda.

Cilj rada je ispitivanje određenih mikroorganizama koji ukazuju na kontaminaciju u ključnim fazama proizvodnje kao i celokupni uticaj higijene procesa proizvodnje na mikrobiološku bezbednost sladoleda.

Ispitivano je 200 uzoraka različitih vrsta sladoleda. Uzorci su uzimani iz fabrika tokom 12 meseci i mikrobiološki su ispitivani na prisustvo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp i *Enterobacteriaceae*, što je definisano Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl.glasnik RS 72/2010), kao i koagulaza pozitivne stafilokoke što je definisano Vodičem za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu (2011). Mikrobiološke analize rađene su u skladu sa ISO standardom: *Listeria monocytogenes* SRPS EN ISO 11290-1:2010, *Salmonella* spp SRPS EN ISO 6579:2008, *Enterobacteriaceae* SRPS ISO 21528-2:2009 i koagulaza pozitivne stafilokoke SRPS EN ISO 6888-1:2009

Od ispitivanih 200 uzoraka sladoleda ni u jednom uzorku nije detektovano prisustvo *Enterobacteriaceae* i koagulaza pozitivnih stafilokoka. Rezultat ovih ispitivanih mikroorganizama ukazuje da je higijena procesa proizvodnje bila na visokom nivou. *Salmonella* spp i *Listeria monocytogenes* ukazuju na bezbednost gotovog proizvoda, pri čemu od 200 ispitivanih uzoraka sladoleda ni u jednom nije detektovano prisustvo *Salmonella* spp. Rezultat ispitivanja ovog mikroorganizma ukazuje da je postupak proizvodnje sproveden u skladu dobrom higijenskom praksom. Od 200 ispitivanih uzoraka *Listeria monocytogenes* je detektovana u 10 uzoraka. Ovaj rezultat ukazuje na sekundarnu kontaminaciju proizvoda u 5% analiziranih uzoraka, koja se verovatno javila kao posledica formiranja biofilmova u delu procesa proizvodnje nakon tehnološke faze pasterizacije.

Rezultati ovog ispitivanja naglašavaju probleme širenja patogena kao što je *Listeria monocytogenes*, iako u malom broju ispitivanih slučajeva. U cilju poboljšanja procedura čišćenja i dezinfekcije u pogonima za proizvodnju sladoleda, mora se podići nivo svesti o mogućnosti formiranja biofilмова, koja direktno može uticati na bezbednost gotovog proizvoda.

Ključne reči: *Listeria monocytogenes*, biofilm, sladoled

ZASTUPLJENOST IZOLATA STAPHYLOCOCCUS AUREUS REZISTENTNIH NA PENICILIN I MRSA IZ UZORAKA NAMIRNICA I BRISEVA

Suzana Živadinović Tasić¹, Svetlana Čolović¹, Prof.dr Vera Katić²

¹Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd, Srbija

²Fakultet Veterinarske medicine, Beograd, Srbija

CILJ: Ispitivanje rezistencije na penicilin i ostale beta laktamske antibiotike izolata *Staphylococcus aureus*-a poreklom iz uzoraka namirnica i briseva da bi je uporedili sa osetljivošću na antibiotike izolata iz humanog materijala u istom vremenskom periodu.

METODE: Uzorci su bili hrana spremna za konzumiranje i brisevi sa pribora, opreme, uređaja i ruku zaposlenih na poslovima pripreme i distribucije hrane. Određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u hrani vršeno je metodom SRPS EN ISO 6888-1. Određivanje prisustva koagulaza pozitivnih stafilocoka u brisevima vršeno je metodom VDM 0144. Potvrđivanje *Staphylococcus aureus*-a vršeno je Slidex Staph (Biomerieux) testom. Ispitivanja osetljivosti na antimikrobne lekove vršeno je disk difuzionom metodom. Izolati rezistentni na penicilin i cefoxitin su dodatno testirani na aparatu VITEK 2 compact (Biomerieux)

REZULTATI: Od ispitanih 135 izolata *Staphylococcus aureus*-a iz hrane i briseva, 73,33% je bilo rezistentno na penicilin a 1,48% izolata je bilo MRSA. Procenat rezistencije kod izolata iz kliničkog materijala u istom periodu iznosio je na penicilin 87,33% a MRSA je bilo 1,40%.

ZAKLJUČAK: Rezistencija na penicilin ispitivanih izolata iz hrane i briseva bila je 73,33%, a kod kliničkih izolata iznosila je 87,33% u istom vremenskom periodu. Procenat MRSA kod izolata iz kliničkog materijala iznosio je 1,40%. Dva MRSA izolata (1.48%) iz uzoraka namirnica i briseva bili su poreklom jedan sa brisa ruku radnika zaposlenog na poslovima pripreme hrane, a drugi iz hrane spremne za konzumiranje-salate sa piletinom. U ovom slučaju je u pitanju hrana kojom se prilikom pripreme manipuliše i to može ukazati na poreklo stafilocoka od zaposlenih koji obavljaju poslove pripreme.

Ključne reči: *Staphylococcus aureus*, rezistencija, hrana

NALAZ ENTEROTOKSOGENIH STAFILOKOKA U MEKIM SIREVIMA

Radoslava Savić Radovanović¹, Vera Katić¹, Svetlana Čolović²

¹Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Katedra za higijenu namirnica
animalnog porekla, Beograd, Srbija

²Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd, Srbija

U Republici Srbiji sirevi, koji se mogu naći na tržištu gradskih pijaca se proizvode u individualnim domaćinstvima od kuvanog, ili sirovog mleka, a poreklom su iz različitih geografskih lokaliteta. U procesu proizvodnje ovih sireva koagulacija se odvija dodavanjem sirila u mleko, bez dodavanja poznatih starter kultura, što znači da u procesu zrenje učestvuje samo porodna mikroflora mleka. Veliki broj sireva, prisutan na tržištu gradskih pijaca, se može svrstati u grupu sireva bez zrenja. Budući da se određen broj sireva bez zrenja proizvodi od sirovog mleka kao deo tradicije, postoji mogućnost da sa sirovim mlekom u sir dospeju patogeni mikroorganizmi kao što su koagulaza pozitivne stafilocoke.

Glavni predstavnik koagulaza pozitivnih stafilocoka je *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. Bitna karakteristika mikroorganizma je sposobnost da stvara ekstracelularne enzime i toksine. Sa gledišta higijene mleka značajna je osobina *S. aureus* da stvara termotabilne enterotoksine, koji mogu da izazovu alimentarna trovanja ljudi.

Cilj ovog rada je bio da se ispita prisutvo enterotoksogenih stafilocoka u sirevima na tržištu beogradskih pijaca.

Materijal je predstavljalo 415 uzoraka mekih sireva različite starosti, koji su uzorkovani na 17 pijaca. Izolacija, identifikacija i održavanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka rađeni su standardnom metodom (SRPS EN ISO 6888-2). Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilocoka do vrste rađena je na osnovu biohemijskih osobina pomoću ID 32 Staph-Biomerieux (Francuska).

Sposobnost izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka da stvaraju klasične enterotoksine (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) je ispitana primenom ELFA tehnike VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska). Od ukupno 415 uzoraka uzoraka sireva različite starosti, proizvedenih od kuvanog ili sirovog

mleka, koagulaza pozitivne stafilokoke su dokazane u 85 (20,48%) uzoraka i njihov broj se kretao od 1 do 5,79 log cfu/g. Od 85 izolata koagulaza pozitivnih stafilokoka poreklom iz sireva kod 26 (30,59%) izolata je dokazana sposobnost da stvaraju klasične enterotoksine (SEA-SEE). Sirevi u kojima je dokazano prisusvo enterotosogeih stafilokoka mogu da predstavljaju potencijalni rizik po zdravlje ljudi, jer mogu da sadrže enterotoksine u količinama koje mogu da izazovu intoksikacije.

Ključne reči: *Staphylococcus aureus*, sir, enterotoksini

**ACINETOBACTER SPP BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
SOJA IZOLOVANOG IZ IZVORSKE VODE NA VLASINI****BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ACINETOBACTER
SPP ISOLATED FROM VLASINA SPRING WATER**

Srđan Tasić¹, Dragojlo Obradović² i Irena Tasić³

¹ Visoka Škola Primenjenih Strukovnih Studija, Vranje, Srbija

² Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, Srbija

³ Apoteka Vranje, Vranje, Srbija

Predmet istraživanja je bio *Acinetobacter spp.* Soj je izolovan iz kaptiranog izvora na Vlasini metodom membranske filtracije. Voda ovog izvora koristi se za potrebe rada fabrike vode. Izvorsku vodu karakteriše veoma niska mineralizacija (< 50 mg/L).

Biohemijska karakterizacija urađena je pomoću ID 32 GN automatskog API ATB sistema. Rezultati su interpretirani pomoću baze podataka ver. 3.0.

Dobijen je profil 00270067062 (%id=95.9, T=0.93). Soj je pokazao metaboličku sposobnost za dvanaest supstrata.

Smatra se da vrste *Acinetobacter spp* čine 1,4% svih nozokomijalnih infekcija. Učestalost ovih infekcija nije lako proceniti jer izolacija *Acinetobacter spp* iz kliničkih uzoraka, pored infekcije može biti i posledica kolonizacije. S obzirom da plazmidi i transpozoni igraju važnu ulogu u biologiji *Acinetobacter spp.* kao i to da je ispitivani soj izolovan iz vode za piće neophodno je uraditi i njegovu molekularnu karakterizaciju.

Ključne reči: *Acinetobacter spp*, voda za piće, karakterizacija.

**CITROBACTER FREUNDII BIOHEMIJSKA
KARAKTERIZACIJA SOJA
IZOLOVANOG IZ OLIGOMINERALNE VODE ZA PIĆE**

**BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CITROBACTER
FREUNDII STRAIN ISOLATED FROM OLIGOMINERAL
DRINKING WATER**

Srđan Tasić¹, Dragojlo Obradović² i Irena Tasić³

¹ Visoka Škola Primenjenih Strukovnih Studija, Vranje, Srbija

² Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, Srbija

³ Apoteka Vranje, Vranje, Srbija

Predmet istraživanja je bio soj *Citrobacter freundii* izolovan iz izvorske flaširane vode za piće. Vodu karakteriše veoma niska mineralizacija (< 50 mg/L).

Soj je izolovan metodom membranske filtracije. Biohemijska karakterizacija urađena je pomoću ID 32 GN automatskog API ATB sistema.

Rezultati su interpretirani pomoću baze podataka ver. 3.0 gde je dobijen %id=99.9. Ispitivani soj je pokazao značajan nivo biohemijske aktivnosti jer je bio sposoban da koristi dvadeset najrazličitijih supstrata.

Dodatna ispitivanja pokazala su da je prisutvo *C. freundii* u flaširanoj vodi za piće rezultat sekundarne kontaminacije. *C. freundii* je oportuni patogen koji kod osoba sa oslabljenim imunim sistemom izaziva širok spektar nozokomijalnih infekcija (uključujući i neonatalni meningitis, sa stopom smrtnosti i do 50%).

S obzirom da je *C. freundii* odgovoran za 29% svih oportunističkih infekcija kao i to da je izolovan iz vode za piće neophodno je uraditi i njegovu molekularnu karakterizaciju.

Ključne reči: *Citrobacter freundii*, voda za piće, karakterizacija.

PREDAVANJA PO POZIVU

MIKROMED 2015

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM PLANT SPECIES OF GENUS *Satureja* L.

Mihajilov-Krstev, T.¹, Radnović, D.², Kitić, D.³

¹University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Department of Biology and Ecology, Niš, Serbia

²University of Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Novi Sad, Serbia

³University of Niš, Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Niš, Serbia

In this paper, the chemical composition of essential oils obtained from eight *Satureja* L. species: *S. hortensis* L., *S. horvatii* Šilić, *S. fukarekii* Šilić, *S. montana* ssp. *montana* L., *S. cuneifolia* Ten., *S. kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *S. subspicata* ssp. *subspicata* Vis. and *S. adamovicii* Šilić was investigated, together with their antimicrobial activity against referent strains and multiresistant isolates from the patient's wounds. After the collecting (August – October, 2006) and drying of the aerial parts, hydrodistillation in the Clevenger type apparatus was performed. Chemical composition of the resulting essential oils was investigated using GC and GC/MS analyses. It was concluded that the oils of these species contain terpenes as the main components, among which monoterpenes are dominant (thymol, carvacrol, p-cymene, γ-terpinene, linalool, borneol, terpinene-4-ol, etc.) in relation to sesquiterpenes. Antimicrobial activity of the isolated essential oils was investigated using two methods: disc-diffusion and broth-microdilution method.

The highest antimicrobial activity exhibited essential oils with the highest content of phenol compounds – thymol or carvacrol (isolated from the species *S. hortensis*, *S. horvatii* and *S. montana* ssp. *montana*). With the exception of the strain *P. aeruginosa*, all oils showed microbicidal effect in much lower concentrations than the referent antibiotics. Very significant fact is that, among investigated oils, almost all showed no difference between MIC and MBC/MFC values, so that they exhibit microbicidal/fungicidal effect in very low concentrations. On the basis of obtained results about antimicrobial effect of *Satureja* L. species essential oils, it can be concluded that they can find application as natural food conservances, and also as the source of natural antimicrobials in the treatment of infectious diseases.

Keywords: Genus *Satureja* L, essential oils, antimicrobial activity, microdilution method

Acknowledgments

The authors are very grateful to the Ministry of Education and Sciences of the Republic of Serbia (Grant No. III-41018) and to the Provincial Secretariat for Science and Technological Development of the Autonomous Province of Vojvodina (project "Molecular and phenotypic diversity of taxa of economic and epidemiological importance, and endangered and endemic species in Europe") for the financial support.

INDEKS AUTORA

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| Aborgiba M, 228 | Đukić S, 188 |
| Arsić B, 188 | Filipić B, 152 |
| Atanasievska S, 214 | Filipović I, 232 |
| Babić O, 129 | Folić M, 173 |
| Babić T, 55 | Gajić I, 47, 186, 194 |
| Balint L, 217 | Galić-Živanić N, 43 |
| Banko A, 173 | Galović Jovanović A, 208, 209 |
| Berić T, 126, 188 | Garalejić E, 188 |
| Beškoski V, 204, 205 | Gašić K, 106, 202 |
| Bokan-Hajnal J, 212 | Gligić A, 175 |
| Borožan S, 9 | Gojgić-Cvijović G, 204, 205 |
| Bošković T, 165 | Golić N, 202 |
| Bosnjakovski D, 1 | Gómez-Lucía E, 210 |
| Božić D, 188 | Grego E, 43, 47 |
| Božić Lj, 186 | Grujović M, 198 |
| Branković M, 182 | Hrnjaković Cvjetković I, 8, 208, 209 |
| Brčeski I, 224, 226 | Ilić B, 75 |
| Bulatović M, 230 | Ilić M, 139, 205 |
| Čebedžić R, 226 | Ilić-Tomić T, 158 |
| Čirković I, 188 | Ivanović M, 106, 202 |
| Čolović Čalovski I, 83, 91, 101 | Janežič S, 183 |
| Čolović S, 234, 235 | Jegorović B, 47, 192, 194 |
| Čomić Lj, 198, 220 | Jelesić Z, 41 |
| Čučak D, 129 | Jeremić D, 224, 226 |
| Čupić M, 21, 173 | Jevtović Đ, 179 |
| Cvetković D, 128, 150 | Jordanova N, 1 |
| Danilović B, 206 | Jovanović B, 221 |
| Dapčević R, 219 | Jovanović D, 190 |
| Dimić G, 167 | Jovanović D, 214 |
| Dimitrijević M, 165 | Jovanović G, 216 |
| Dimitrova M, 1 | Jovanović Galović A, 181 |
| Dimkić I, 126 | Jovanović J, 5 |
| Dinić M, 49, 184 | Jovanović Lj, 200 |
| Dolei A, 210 | Jovanović M, 183 |
| Draganić V, 188 | Jovanović M, 221, 223 |
| Drakulović M, 183 | Jovanović S, 183, 192 |
| Duvnjak D, 200 | Jovanović T, 173 |
| Džamić A, 83, 91, 101 | Jovčić B, 152 |
| Džamić A, 221 | Jovičić Petrović J, 116 |
| Džinić N, 206 | Karabasil N, 165 |
| Đokić L, 132 | |

- Katić V, 161, 234, 235
 Kekez B, 204
 Kekić D, 47, 192, 194
 Kitić A, 216
 Kitić D, 240
 Klaus A, 108
 Knežević-Vukčević J, 221, 223, 228
 Kocić B, 49, 55, 75, 184
 Kocić-Tanackov S, 167
 Kojić M, 152, 202
 Kolarević S, 224, 226, 228
 Kostić J, 228
 Kovačević G, 171, 208, 209
 Kovačević-Jovanović V, 35
 Kovrljija G, 212
 Kozarski M, 108
 Kračun-Kolarević M, 228
 Krunić T, 230
 Kuzmanović N, 106, 202
 Lalošević D, 172
 Lavigne R, 210
 Lazarević I, 28, 173
 Lazović M, 200
 Lekić J, 182
 LePoder S, 210
 Ličina B, 198
 Lješević M, 204
 Logue C, 210
 Lozo J, 188
 Malešević M, 152
 Marin P, 221
 Markov S, 137, 150
 Matić S, 216
 Matijašević D, 200
 Mihajlov-Krstev T, 240
 Mihajlović K, 232
 Mihajlović-Ukropina M, 41
 Mijač V, 47
 Miladinović D, 75
 Miladinović Tasić N, 99
 Milić J, 139
 Milić N, 9
 Miličević B, 206
 Miljković Selimović B, 55
 Milosavljević S, 217
 Milošević V, 8, 171, 177, 181, 208, 209
 Mitić-Ćulafić D, 221, 223
 Mitrović S, 83, 91, 101
 Mladenović K, 198
 Mladenović-Antić S, 184
 Nastasić-Femić J, 196
 Nikčević D, 219
 Nikčević Ž, 219
 Nikolić B, 221, 223
 Nikolić N, 208, 209
 Nikolić V, 5, 175, 179
 Nikšić M, 108, 200
 Nišavić J, 9
 Novaković Jovanović J, 223
 Novović K, 152
 Obradović A, 106, 202
 Obradović D, 237, 238
 Opavski N, 47, 186, 194
 Pantić M, 200
 Papić Damjanović D, 182
 Patić A, 208, 209
 Paunović M, 5
 Pavlović Lj, 43
 Pešić-Pavlović I, 179
 Popović R, 216
 Popović S, 205
 Prokić A, 106, 202
 Protić-Đokić V, 214
 Radin D, 163, 210
 Radnović D, 129, 240
 Radoja M, 205
 Radojević I, 198, 220
 Radovanov J, 177, 208, 209
 Raičević V, 116
 Raketić S, 168, 190
 Rakin M, 230

Randelović G, 184	Vasiljević I, 200
Ranin J, 179	Vasiljević Z, 152
Ranin L, 47, 186, 192, 194	Velebit B, 163
Ristanović E, 214	Velićanski A, 128, 137, 150
Rupnik M, 183	Vidaković A, 137
Salemović D, 179	Vranješ N, 172
Savić D, 206	Vrvić M, 204, 205
Savić Radovanović R, 235	Vujin D, 172
Simić V, 224, 226	Vukašinović-Sekulić M, 230
Simin V, 172	Vuković-Gačić B, 223, 224, 226, 228
Stamenković G, 5, 175	Vunduk J, 108
Stankov S, 172	Wölk B, 210
Stanković S, 126, 188	Zavišić G, 223
Stanojević M, 5, 175, 179	Zdravkovska M, 1
Stefanović O, 198, 220	Zlatković N, 106, 202
Stefanović S, 194	Zorić A, 9
Stevanović G, 173	Zurovac A, 128
Stojanović M, 161	Živadinović Tasić S, 234
Stojanović P, 184	Žižak Ž, 108
Stojanović Varagić Z, 183	
Stojanovska Z, 1	
Stojković M, 194	
Stošović B, 183	
Sunjog K, 228	
Szyndel M, 210	
Šeatović S, 223	
Šiljić M, 175, 179	
Škrinjar M, 167	
Šmitran A, 186	
Šumanov V, 168	
Taleski V, 1	
Tamaš I, 129, 131	
Tasić I, 237, 238	
Tasić S, 237, 238	
Todorović M, 179	
Tojčić T, 216	
Tolinački M, 202	
Tomanović S, 194	
Tošić T, 183	
Travar M, 192	
Vasić S, 220	